

Mia40 ist optimiert für die duale Funktion als Proteinimport- und Faltungshelfer in Mitochondrien

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

– Doktor der Naturwissenschaften –

Eingereicht an der
Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und
Naturwissenschaften (BayNat)
im Bereich Molekulare Biowissenschaften

Vorgelegt von
Diplom Biochemikerin

Johanna Koch

Bayreuth 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2009 bis März 2014 in Bayreuth am Lehrstuhl Biochemie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Franz Xavier Schmid angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 11. März 2014

Zulassung durch das Leitungsgremium: 03. April 2014

Wissenschaftliches Kolloquium: 25. Juli 2014

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Xavier Schmid

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Franz Xavier Schmid	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Thomas Scheibel	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Benedikt Westermann	(Vorsitz)
Prof. Dr. Birgitta Wöhr	

Drittgutachter: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die oxidative Faltung von Proteinen	1
1.1.1	Oxidative Faltung im bakteriellen Periplasma	2
1.1.2	Oxidative Faltung im endoplasmatischen Retikulum.....	3
1.2	Oxidative Faltung im Intermembranraum von Mitochondrien.....	4
1.2.1	Die mitochondriale Thioloxygenase Mia40	4
1.3	Mia40 verbindet Import und Oxidation von Substraten in Mitochondrien	5
1.4	Die Sulfhydryloxygenase Erv1	7
1.5	Die Substrate des mitochondrialen Disulfidstoffwechsels	8
1.6	Das sliding-and-docking Modell	9
1.7	Problemstellung.....	10
2	Material und Methoden	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	13
2.1.2	Nährmedien	13
2.1.3	Enzyme, Proteine und DNA-Standards	13
2.1.4	Oligodesoxyribonukleotide	14
2.1.5	Chemikalien.....	14
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.7	Geräte	15
2.1.8	Computerprogramme.....	16
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Gelelektrophoretische Methoden.....	16
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.2.3	Fermentation und Reinigung der Protein-Varianten	20
2.2.4	Modifikation von Proteinen.....	24
2.2.5	Spektroskopische Charakterisierung	25
2.2.6	Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge.....	27
2.2.7	Interaktion von Mia40 und Cox17*	28
2.2.8	Bestimmung der pK-Werte von Cysteinen.....	30
2.2.9	Bestimmung von Reduktionspotentialen.....	31
2.2.10	Oxidative Rückfaltung von RNase A als Test auf Disulfidisomeraseaktivität.....	32
3	Ergebnisse und Diskussion	33

3.1	Konstruktion von Eindisulfidvarianten von Cox17*	34
3.2	Mia40 bildet nicht kovalente Komplexe mit entfalteten Proteinen	36
3.3	Die räumliche Nähe von Substratbindungsstelle und aktivem Zentrum steuert die Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17	40
3.3.1	Die intrinsische Reaktivität der Cysteine in Cox17	44
3.3.2	Die Ionisierungseigenschaften von Cox17	45
3.3.3	Die MISS/ITS Sequenz beeinflusst die Komplexbildung	47
3.3.4	Die Reaktivität von Cys36 wird durch benachbarte hydrophobe Reste bestimmt	51
3.3.5	Hydrophobe Reste in der Umgebung von Cys26 erhöhen die Reaktivität	53
3.3.6	Analyse der Umgebung der Cysteine in CX ₉ C-Substraten von Mia40	55
3.4	Die konformationelle Faltung des Substrats ist die Triebkraft für die Oxidation durch Mia40	58
3.4.1	Ein Überschuss an Mia40 oxidiert Cox17 vollständig	58
3.4.2	Mia40 differenziert zwischen vollständig und teilweise oxidierten Substraten	62
3.4.3	Katalytische Mengen Mia40 oxidieren Cox17 in Anwesenheit von Erv1	65
3.4.4	Mia40 ist eine Disulfidisomerase	67
3.4.5	Kinetische Selektion und konformationelle Stabilisierung bestimmen die Reihenfolge der Disulfidbildung in Cox17* durch Mia40	74
3.5	Hydrophobe Interaktionen zwischen Mia40 und Cox17 stabilisieren das gemischte Disulfid	78
3.5.1	Einfluss des katalytischen Motivs auf die Stabilität des gemischten Disulfids	79
3.5.2	Die oxidierte Form von Mia40 ist stabilisiert	81
3.5.3	Ionisierungseigenschaften des katalytischen Disulfids von Mia40	82
3.5.4	Die Stabilität des gemischten Disulfids	90
3.5.5	Das Reduktionspotential von Mia40	91
3.5.6	Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Mia40 und Cox17* stabilisieren das gemischte Disulfid	96
3.5.7	Cox17* ist im gemischten Disulfid mit Mia40 entfaltet	101
4	Zusammenfassende Diskussion	105
4.1	Der Faltungszustand der Substrate bestimmt die Bindungsaffinität zu Mia40	105
4.2	Mia40 reagiert spezifisch mit Cysteinen in hydrophober Umgebung	106
4.3	Die gemischten Disulfide mit Mia40 werden durch hydrophobe Interaktionen stabilisiert	106
4.4	Die konformationelle Faltung des Substrats und die kinetische Kontrolle von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen steuern die oxidative Faltung durch Mia40	108
4.5	Mia40 ist eine Disulfidisomerase	109

4.6	Modell für die Oxidation von Cox17 durch Mia40	109
4.7	Die katalytischen Eigenschaften von Mia40 entsprechen den Anforderungen an einen Faltungshelfer im mitochondrialen Intermembranraum	111
5	Publikationsliste.....	115
6	Zusammenfassung	117
7	Summary	119
8	Abkürzungsverzeichnis	123
9	Literaturverzeichnis	127
10	Anhang	133
10.1	Anhang – Tabellen.....	133
10.2	Anhang – Abbildungen.....	137

1 Einleitung

Alle aerob lebenden Organismen sind der schädigenden Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt. ROS entstehen durch endogene Prozesse, wie die oxidative Phosphorylierung (Drose & Brandt, 2012), oder durch äußere Einflüsse, wie UV-Strahlung oder Xenobiotika (Aroun *et al.*, 2011; Zangar *et al.*, 2004) und schädigen DNA, Proteine und Lipide. Sie werden mit Krebs (Trachootham *et al.*, 2009), neurodegenerativen Krankheiten (Shukla *et al.*, 2011) und Diabetes (Paravicini & Touyz, 2006) in Verbindung gebracht. Um die Zellen vor oxidativem Stress zu schützen, müssen unkontrollierte Oxidationsprozesse verhindert werden. Daher existieren effektive Schutzmechanismen, um den Redoxstatus der Zelle konstant und das Cytosol in reduziertem Zustand zu halten. Hierbei handelt es sich um Enzyme, wie die Thioredoxin- und Glutaredoxin-Systeme (Holmgren & Aslund, 1995; Nakamura *et al.*, 1997), oder Antioxidantien, wie Glutathion. Glutathion spielt eine bedeutende Rolle als zentraler Redoxpuffer, da reduziertes Glutathion (GSH) den größten Anteil an freien Thiolen in der Zelle ausmacht und reversibel zu GSSG oxidiert werden kann (Schafer & Buettner, 2001).

Sowohl Glutathion, als auch Thioredoxin und Glutaredoxin nutzen die reversible Oxidation von Cysteinseitenketten zu Disulfiden, um Veränderungen des Redoxgleichgewichts zu erkennen und ROS zu neutralisieren (Brandes *et al.*, 2009; Klomsiri *et al.*; Klomsiri *et al.*, 2011). Bei der Reaktion von ROS mit Cysteinthiolen entsteht Sulfonsäure als instabiles Intermediat, das unter Ausbildung intra- oder intermolekularer Disulfide sofort mit benachbarten Cysteinen in GSH oder anderen Proteinen reagiert (Rehder & Borges, 2010).

1.1 Die oxidative Faltung von Proteinen

Neben Enzymen mit redoxaktiven Disulfiden, wie beispielsweise Thioredoxin, existiert eine große Anzahl an Proteinen, die strukturelle Disulfide enthalten. Diese werden nicht, wie bei der Oxidation durch ROS, über Sulfonsäureintermediate gebildet, sondern durch gerichtete Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen. Strukturelle Disulfide haben in den meisten Fällen eine stabilisierende Wirkung auf die Proteinstruktur (Creighton, 1978; Goldenberg *et al.*, 1993; Goto & Hamaguchi, 1982). Dies wird zum einen durch eine Destabilisierung der ungefalteten Polypeptidkette durch Verringerung ihrer Entropie und zum anderen durch Stabilisierung der nativen Struktur durch die Interaktion mit hydrophoben Seitenketten erreicht (Wedemeyer *et al.*, 2000). Eine Stabilisierung durch Disulfide ist besonders wichtig für extrazelluläre Proteine und Proteine thermophiler Organismen (Mallick *et al.*, 2002; Zavodszky *et al.*, 2001). In der Biotechnologie stellen die Stabilisierung von Proteinen durch rationales Design von Disulfiden und die Herstellung disulfidhaltiger Proteine nach wie vor eine große Herausforderung dar. Eine Optimierung dieser Prozesse ist jedoch essentiell, da

disulfidhaltige Proteine, wie Insulin und therapeutische Antikörper, in großen Mengen für medizinische Zwecke benötigt werden.

Der Prozess der oxidativen Faltung umfasst neben der Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturelementen auch die Bildung von Disulfidbrücken. Die Oxidation von Cysteinen ist häufig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinfaltung. Bereits 1961 entdeckte Anfinsen in Pionier-Experimenten, dass reduzierte und denaturierte RNase A in Rückfaltungspuffer spontan die vier nativen Disulfide ausbilden kann (Anfinsen *et al.*, 1961). Dieser Prozess ist jedoch sehr langsam und beinhaltet komplexe Oxidations-, Reduktions- und Isomerisierungsprozesse.

Der Verlauf der oxidativen Faltung wird im Wesentlichen von drei Faktoren bestimmt: der räumlichen Nähe, der Reaktivität und der Zugänglichkeit von Disulfiden und Cysteinen. Hierbei beeinflussen sich die konformationelle Faltung und die Oxidation gegenseitig, da die Bildung von Strukturelementen die chemische Umgebung und die Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen verändert. Während der oxidativen Faltung kommt es in vielen Fällen zunächst zur Bildung nicht nativer Disulfide zwischen Cysteinen, die in der Primärsequenz benachbart sind. Diese Intermediate sind in der Regel nicht stabil gefaltet. Die fehlende Strukturierung hält die Disulfide und Cysteine meist gut zugänglich und flexibel für weitere Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, so dass sich ein Gleichgewicht verschiedener nicht nativer Spezies bildet (Rothwarf & Scheraga, 1993; Ruoppolo *et al.*, 2000; Thannhauser *et al.*, 1997). Die Verteilung der Spezies wird in erster Linie entropisch von der Größe der gebildeten Schleifen bestimmt, es spielen aber auch enthalpische Effekte eine Rolle (Volles *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1996). Sobald korrekte Disulfide ausgebildet sind, können diese Intermediate eine nativ-ähnliche Struktur einnehmen. Diese schützt die Disulfide vor Reduktion und führt so zu einem „Einrasten“ (*locking in*) der Struktur, weshalb Intermediate mit korrekten Disulfiden akkumulieren (Pace & Creighton, 1986; Rothwarf *et al.*, 1998; Thannhauser *et al.*, 1997; Wedemeyer *et al.*, 2000). Auf diese Weise wird der oxidative Faltungsweg zum nativen Zustand hin gesteuert.

In der Zelle findet oxidative Faltung nur in bestimmten Kompartimenten statt. Das Cytosol bildet eine reduzierende Umgebung mit hohen GSH-Konzentrationen und hält auf diese Weise die meisten Proteine im reduzierten Zustand. Oxidierende Kompartimente enthalten spezialisierte Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen, die die Übertragung von Disulfiden auf Substratproteine katalysieren.

1.1.1 Oxidative Faltung im bakteriellen Periplasma

Das Oxidationssystem Gram-negativer Bakterien befindet sich im Periplasma und besteht aus den Dsb (*disulfide bond*) Proteinen. Die Thioloxygenase DsbA überträgt Disulfide durch eine Redoxreaktion auf Substratproteine und liegt nach der Katalyse reduziert vor. Daher muss sie anschließend durch die Interaktion mit DsbB regeneriert werden (Bardwell *et al.*, 1991; Kamitani *et al.*, 1992; Missiakas *et al.*, 1993). DsbA besteht aus einer katalytischen

Thioredoxin-ähnlichen Domäne und einem helikalen Substratbindungsbereich (Martin *et al.*, 1993) (Abbildung 1 a). Das katalytische Disulfid ist als Cys-Pro-His-Cys-Motiv angeordnet. Es ist sehr labil und weist mit -120 mV ein extrem hohes Reduktionspotential auf (Zapun *et al.*, 1993). Die hohe Oxidationskraft ist auf den stark erniedrigten pK-Wert des N-terminalen Cysteins von 3,5 zurückzuführen. Ein niedriger pK-Wert verbessert die Eigenschaften eines Cysteins als Abgangsgruppe, was das Disulfid stark destabilisiert (Grauschopf *et al.*, 1995). DsbA oxidiert bevorzugt Cysteine, die sich in räumlicher Nähe entlang der Proteinkette befinden (Sone *et al.*, 1997). In Substratproteinen mit komplexer Disulfidverbrückung führt dies häufig zu nicht nativen Disulfiden. Diese werden durch die Disulfidisomerase DsbC (Abbildung 1 b) in den nativen Zustand überführt (Bader *et al.*, 1998; Porat *et al.*, 2004; Zapun *et al.*, 1995).

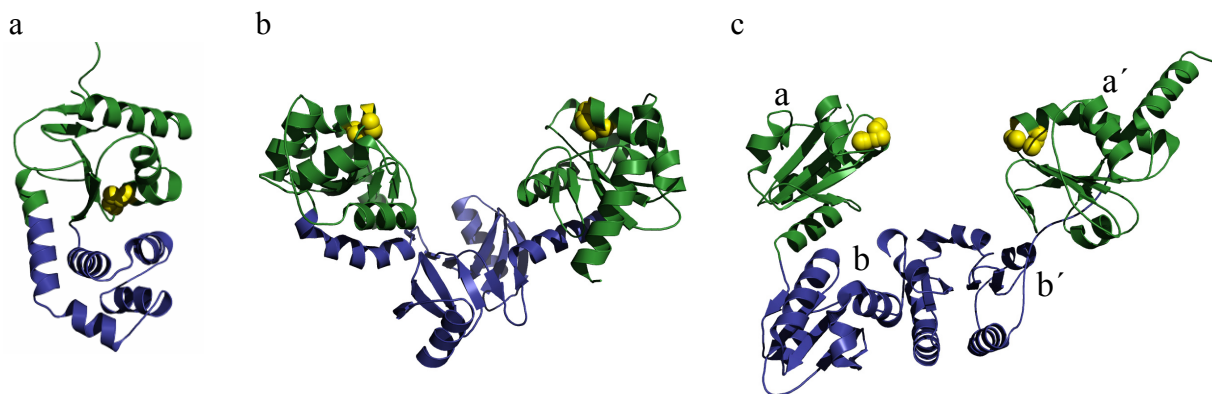


Abbildung 1: Struktur von bakteriellen und eukaryotischen Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen. Gezeigt sind (a) DsbA und (b) DsbC aus *E. coli*, sowie (c) PDI aus *S. cerevisiae*. Die katalytischen Thioredoxin-ähnlichen Domänen sind in grün, die Substratbindungsdomänen in blau gezeigt. Die katalytisch aktiven CXXC-Motive sind als gelbe Kugeln dargestellt. Die Strukturen wurden mit dem Programm PyMol und den pdb-Einträgen 1DSB, 1EEJ und 2B5E erstellt.

1.1.2 Oxidative Faltung im endoplasmatischen Retikulum

Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) war das erste entdeckte Faltungshelferenzym (Goldberger *et al.*, 1963; Venetianer & Straub, 1963) und kommt in hohen Konzentrationen im endoplasmatischen Retikulum (ER) vor (Lambert & Freedman, 1985). Hier werden insbesondere sekretorische Proteine, die reduziert und entfaltet aus dem Cytosol importiert werden, oxidiert und modifiziert.

PDI ist ein Multidomänenprotein, das aus vier Thioredoxin-ähnlichen Domänen, in der Anordnung a-b-b'-a' aufgebaut ist (Abbildung 1 c). Die katalytisch aktiven a- und a'-Domänen enthalten je ein aktives Zentrum mit einem Cys-Gly-His-Cys-Motiv (Freedman *et al.*, 1998; Holst *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2006), mit einem Reduktionspotential von ca. -180 mV (Lundstrom & Holmgren, 1993). Das N-terminale Cystein zeigt einen stark erniedrigten pK-Wert von 4,4 bis 6,7 (Hawkins & Freedman, 1991; Kortemme *et al.*, 1996; Ruddock *et al.*, 1996), während der pK-Wert des C-terminalen Cysteins so hoch ist, dass er

nicht bestimmt werden kann, da das Protein bei sehr hohen pH-Werten denaturiert wird. Experimentelle Befunde zeigen, dass er ≥ 10 sein muss und Berechnungen ergaben einen Wert von 12,8 (Lappi *et al.*, 2004). Die katalytisch nicht aktiven b- und b'-Domänen sind für die Bindung entfalteter Substrate nötig.

PDI besitzt nicht nur Thioloxygenase-, sondern auch Disulfidisomerasefunktion, d.h. nicht native Disulfide in Substratproteinen können in die korrekte Verbrückung überführt werden. Das Gleichgewicht zwischen dem oxidierten Enzym, das für die Substratoxygenation verantwortlich ist, und dem reduzierten Enzym mit Isomerasefunktion wird durch die FAD-haltige Sulphydryloxygenase Ero1 und reduziertes Glutathion eingestellt (Frand & Kaiser, 1999; Gross *et al.*, 2004; Pollard *et al.*, 1998).

1.2 Oxidative Faltung im Intermembranraum von Mitochondrien

Mitochondrien sind über Porine in der äußeren Membran mit dem Cytosol verbunden. Glutathion kann frei durch die Porine diffundieren, weshalb der Intermembranraum (IMS) lange als reduzierendes Kompartiment und das ER als einziger Ort der Disulfidbildung in Eukaryoten angesehen wurde. Es wurden jedoch zunehmend Proteine mit strukturellen Disulfiden im IMS entdeckt. Ihre Cysteine sind hoch konserviert und essentiell für die Funktion der Proteine und deren Import aus dem Cytosol (Iwata *et al.*, 1998; Mukai *et al.*, 1985; Tsukihara *et al.*, 1995). Tatsächlich konnte im IMS ein Disulfid-Staffelsystem bestehend aus der Thioloxygenase Mia40 und der Sulphydryloxygenase Erv1 identifiziert werden (Chacinska *et al.*, 2004; Mesecke *et al.*, 2005; Naoe *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005).

1.2.1 Die mitochondriale Thioloxygenase Mia40

Mia40 (*Mitochondrial import and assembly*) ist ein in Hefe essentielles Protein (Terziyska *et al.*, 2005; Winzeler *et al.*, 1999) und in Eukaryoten von Pilzen bis zu Pflanzen und Tieren konserviert. Topologisch ist der IMS äquivalent zum bakteriellen Periplasma. Dennoch zeigt die Thioloxygenase Mia40 keinerlei strukturelle Ähnlichkeit zu DsbA oder DsbC. Im Gegensatz zu den meisten anderen Oxidoreduktasen enthält Mia40 keine Thiorodoxin-ähnliche Domäne. Die Kerndomäne von Mia40 (AS 284-365) aus *S. cerevisiae* konnte als MBP-Fusionsprotein kristallisiert und die Struktur mit einer Auflösung von 3 Å gelöst werden (Kawano *et al.*, 2009). Weiterhin wurde die Struktur von humanem Mia40 in Lösung bestimmt, wobei beide Strukturen in weiten Teilen identisch sind (Banci *et al.*, 2009).

Die zwischen den Spezies stark konservierte globuläre Domäne von Mia40 besteht aus zwei antiparallelen α -Helices, die durch zwei strukturelle Disulfide stabilisiert werden (Abbildung 2 a). Die vier Cysteine der strukturellen Disulfide sind als zwei CX₉C-Motive angeordnet, d.h. zwei Cysteine sind durch jeweils neun andere Aminosäuren getrennt. In diesem Bereich kommen viele hochkonservierte, hydrophobe Aminosäuren vor. Sie bilden eine, dem katalytischen Zentrum benachbarte, hydrophobe Furche zur Erkennung und Bindung entfalteter Substratproteine (Abbildung 2 b). Damit besitzt Mia40 im Gegensatz zu den

Thioredoxin-ähnlichen Oxidoreduktasen, wie DsbA und PDI, keine separate, spezialisierte Substratbindungsdomäne. Das katalytisch aktive Disulfid liegt in einem flexiblen Segment des Proteins, das über hydrophobe Wechselwirkungen auf die globuläre Kerndomäne packt. Es ist nicht wie in anderen Oxidoreduktasen als CXXC-, sondern als CPC-Motiv angeordnet.

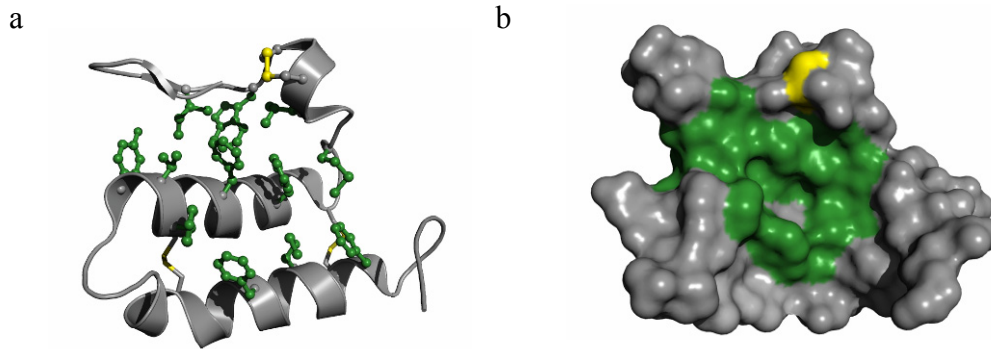


Abbildung 2: Struktur von Mia40. (a) Gezeigt ist die Struktur der globulären Domäne von Mia40 aus *S. cerevisiae*. Die Schwefelatome des katalytischen Disulfids sind gelb, die Reste, die die hydrophobe Furche bilden, grün eingefärbt. (b) Oberflächendarstellung von Mia40. Farbgebung und Orientierung entsprechen Teilabbildung (a). Die Strukturen wurden mit dem Programm PyMol und dem pdb-Eintrag 2ZXT erstellt.

Die N- und C-Termini des Proteins bestehen aus ausgedehnten ungeordneten Bereichen, die in den Strukturen nicht aufgelöst sind. In Hefe bildet der N-Terminus zusätzlich einen Membrananker, über den Mia40 in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist (Chacinska *et al.*, 2004; Naoe *et al.*, 2004), während Mia40 in höheren Eukaryonten löslich im IMS vorliegt. Es konnte jedoch in Komplementationsexperimenten gezeigt werden, dass der strukturierte, globuläre Teil des humanen Proteins ausreicht um in Hefe die biologische Funktion zu erfüllen (Chacinska *et al.*, 2008).

1.3 Mia40 verbindet Import und Oxidation von Substraten in Mitochondrien

Mia40 wurde ursprünglich als Importfaktor für den Transport von Proteinen aus dem Cytosol in Mitochondrien entdeckt, woher auch der Name *Mitochondrial import and assembly* herrührt. Die Proteine des IMS sind im Zellkern kodiert und müssen nach der Synthese im Cytosol in die Mitochondrien transportiert werden (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Viele Proteine des IMS enthalten keine Signalsequenz, dafür aber konservierte Cysteinreste und werden über den TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*) importiert. Der Import- und Oxidationsmechanismus dieser Proteine ist schematisch in Abbildung 3 gezeigt. Da die TOM-Pore nur eine Größe von 22 bis 26 Å hat, können lediglich reduzierte, entfaltete Proteine transportiert werden (Schwartz & Matouschek, 1999). Ob die IMS-Proteine spezifisch von Rezeptoren des TOM-Komplexes rekrutiert werden, oder spontan durch die Pore diffundieren ist dabei noch nicht geklärt. Nach dem Import wird das Substrat unter Ausbildung eines stabilen, gemischten Disulfids mit Mia40 oxidiert (Chacinska *et al.*, 2004;

Milenkovic *et al.*, 2007). In einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion werden Elektronen vom Substrat auf Mia40 übertragen, was zur Bildung einer Disulfidbrücke im Substrat führt. Nach der Freisetzung aus dem Komplex mit Mia40 liegt das Substrat oxidiert und gefaltet vor (Mesecke *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2008). Da native Proteine die TOM-Pore nicht mehr passieren können, werden die Substrate durch Interaktion mit Mia40 nach der *folding trap* Hypothese im IMS gehalten (Allen *et al.*, 2003; Lutz *et al.*, 2003). Nach der Katalyse ist das katalytische Disulfid in Mia40 reduziert und damit inaktiv. Um den aktiven Ausgangszustand zu regenerieren, interagiert Mia40 mit Erv1 (Kapitel 1.4) und wird von diesem oxidiert (Allen *et al.*, 2005). In Abwesenheit von Erv1 akkumuliert Mia40 in reduzierter Form (Mesecke *et al.*, 2005).

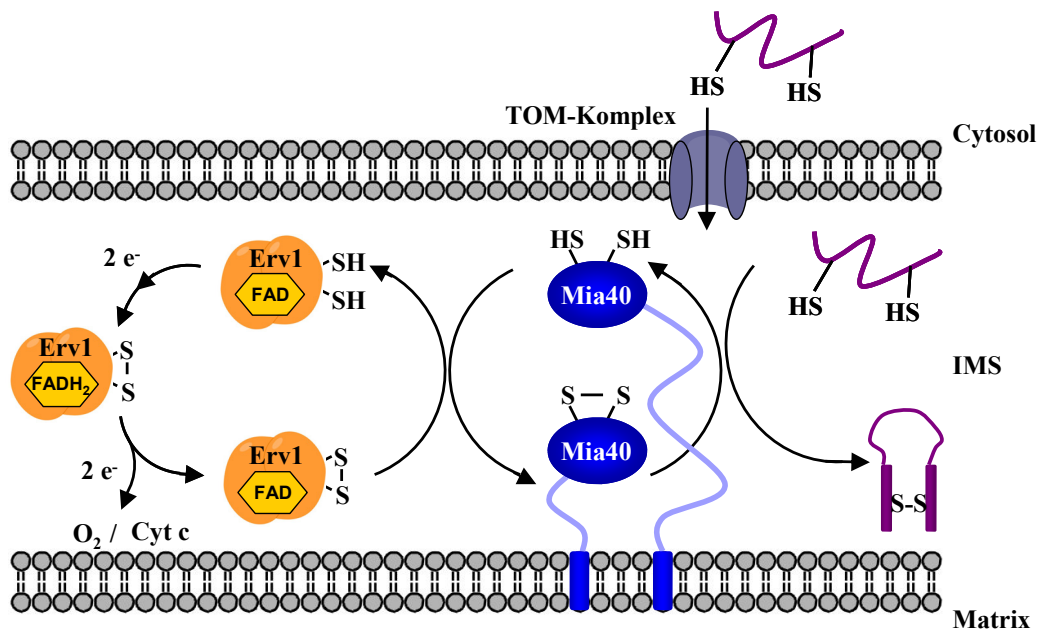


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Substratoxidation in Mitochondrien. Cysteinhaltige Proteine (violett) werden im reduzierten Zustand aus dem Cytosol durch die TOM-Pore in den mitochondrialen Intermembranraum (IMS) transportiert. Dort werden sie durch die Thioloxidase Mia40 oxidiert. Das reduzierte katalytische Disulfid von Mia40 wird durch die FAD-haltige Sulfhydryloxidase Erv1 reoxidiert. Erv1 kann Elektronen sowohl an molekularen Sauerstoff, als auch an Cytochrom c weitergeben und so das Oxidationssystem mit der Atmungskette koppeln.

Mia40 und Erv1 bilden ein Disulfidstaffelsystem, in dem Elektronen vom reduzierten Substrat unter Bildung von Disulfiden weitergeleitet werden (Abbildung 4). Der Elektronenfluss geht dabei generell in Richtung des positiveren Reduktionspotentials und wird durch spezifische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen gesteuert. Das Reduktionspotential der strukturellen Disulfide der Mia40-Substrate liegt im Bereich von -310 bis -340 mV (Banci *et al.*, 2008a; Lu & Woodburn, 2005; Tienison *et al.*, 2009; Voronova *et al.*, 2007), weshalb diese im IMS, der ein Reduktionspotential von ca. -255 mV aufweist, sehr stabil sein sollten (Hu *et al.*, 2008). Für die Oxidation eines Substrates mit zwei Disulfiden werden zwei mal je zwei Elektronen auf Mia40 unter Reduktion des katalytischen Disulfids übertragen. Von dort fließen je zwei Elektronen auf die Sulfhydryloxidase Erv1, zunächst in Richtung des

negativeren Reduktionspotentials auf das N-terminale Disulfid, was im Bezug auf die Elektronenaffinität ein ungünstiger Prozess ist. Es muss jedoch beachtet werden, dass Reduktionspotentiale im Gleichgewicht, unter *in vitro* Bedingungen bestimmt werden und im natürlichen System und unter kinetischer Kontrolle anders sein können. In Erv1 wird final der Kofaktor FAD reduziert (Gross *et al.*, 2002; Vitu *et al.*, 2006). FAD ermöglicht es, die ursprüngliche Übertragung von je einem Elektronenpaar aus der Reduktion eines Disulfids, auf die Übertragung eines einzelnen Elektrons auf Häm umzustellen, indem ein FAD-Semiquinon als Intermediat genutzt wird (Deponte & Hell, 2009). Von FAD können die Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen werden, was jedoch zur Bildung von toxischem H_2O_2 führt. Alternativ kann Cytochrom c als Akzeptor dienen (Bihlmaier *et al.*, 2007). In wie weit beide Wege in der Zelle verwendet werden ist nicht bekannt, allerdings ist Cytochrom c *in vitro* der bevorzugte Reaktionspartner für reduziertes Erv1 (Allen *et al.*, 2005; Bien *et al.*, 2010; Bihlmaier *et al.*, 2007; Farrell & Thorpe, 2005; Tienison *et al.*, 2009). In Hefe gibt es Hinweise auf einen anaeroben Elektronenakzeptor, der jedoch noch nicht identifiziert werden konnte (Dabir *et al.*, 2007). Weiterhin ist nicht bekannt, ob ein solches System auch in anderen Eukaryoten existiert. Cytochrom c transferiert die Elektronen über die Cytochrom c Oxidase in die Atmungskette (Bihlmaier *et al.*, 2007), wo Sauerstoff als terminaler Akzeptor dient.

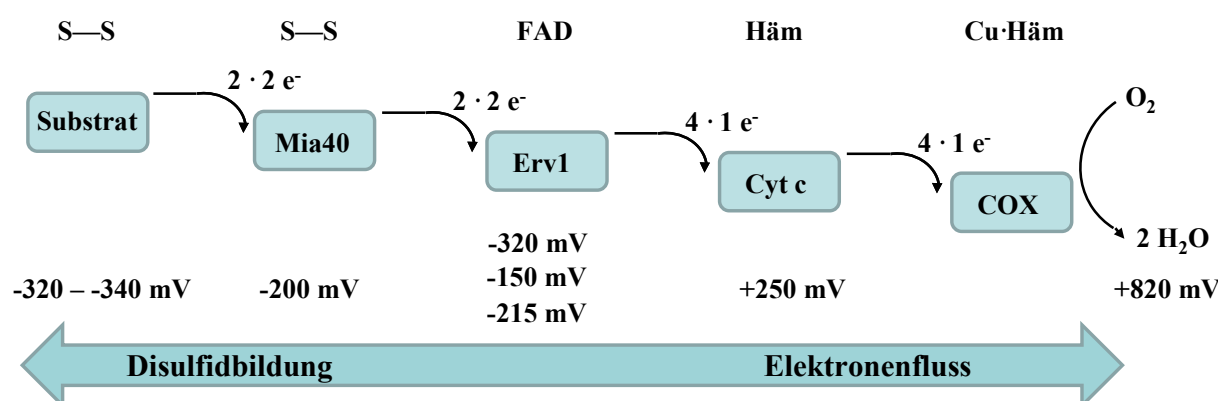


Abbildung 4: Schematischer Ablauf des Elektronenflusses bei Oxidation eines Substratproteins mit zwei Disulfiden durch Mia40. Es sind die Proteine gezeigt, die an der Elektronentransportkette beteiligt sind, sowie die Anzahl an Elektronen, die jeweils übertragen werden. Die chemischen Gruppen, die die Elektronen aufnehmen, sind entweder die Seitengruppen der Cysteine, oder FAD- bzw. Häm-Kofaktoren. Als terminaler Akzeptor dient molekularer Sauerstoff. Die Reduktionspotentiale dieser Gruppen sind ebenfalls angegeben und wurden den Referenzen (Banci *et al.*, 2009; Dabir *et al.*, 2007; Voronova *et al.*, 2007) entnommen. Für Erv1 sind die Reduktionspotentiale des N- und C-terminalen Disulfids, sowie von FAD angegeben.

1.4 Die Sulfhydryloxidase Erv1

Erv1 (*essential for respiration and vegetative growth*) wurde zunächst als stoffwechselaktives Protein entdeckt, da Hefezellen mit defektem Erv1 Störungen der Atmungskette und des Zellwachstums zeigten (Dabir *et al.*, 2007; Lisowsky, 1992). Außerdem waren Morphologie und Verteilung der Mitochondrien, die Biogenese von FeS-Clustern und der Gehalt an

Proteinen des IMS beeinflusst (Allen *et al.*, 2005; Mesecke *et al.*, 2005; Rissler *et al.*, 2005). Später wurde gefunden, dass es sich bei Erv1 um eine Sulfhydryloxidase handelt. Sulfhydryloxidasen können *de novo* Disulfide generieren, da sie Elektronen über Kofaktoren direkt an Sauerstoff abgeben können. Thioloxygenasen sind dagegen nur in der Lage Disulfide zu übertragen. Das Substrat von Erv1 im IMS ist Mia40, das nach der Oxidation von Substraten reduziert und damit inaktiv vorliegt und durch Erv1 regeneriert wird (Mesecke *et al.*, 2005; Rissler *et al.*, 2005).

Erv1 aus Hefe bildet ein nicht kovalentes Homodimer, wobei jede Untereinheit ein strukturelles und zwei redoxaktive Disulfide, sowie je einen FAD-Kofaktor enthält (Gross *et al.*, 2002). Reduziertes Mia40 überträgt seine Elektronen zunächst auf das sogenannte Transport-Disulfid (*shuttle disulfide*), das in einem flexiblen Segment liegt und so optimal mit Mia40 interagieren kann. Von dort werden die Elektronen auf ein weiteres Disulfid (*catalytic disulfide*) überführt, das sich in direkter Nachbarschaft zum FAD-Kofaktor befindet, und so die Elektronen leicht auf diesen übertragen kann. FAD kann nun die Elektronen je nach Bedarf auf O₂ als Endakzeptor, oder auf Cytochrom c in der Atmungskette übertragen.

1.5 Die Substrate des mitochondrialen Disulfidstaffelsystems

Die meisten Proteine, die aus dem Cytosol in die Mitochondrien transportiert werden enthalten Signalsequenzen, durch die sie gerichtet in die Matrix, oder die innere bzw. äußere Membran gelangen (Chacinska *et al.*, 2009; Herrmann & Riemer, 2010; Neupert & Herrmann, 2007). Allerdings konnten nur für wenige Proteine des IMS solche Signalsequenzen identifiziert werden (Herrmann *et al.*, 2012; Herrmann & Riemer, 2010), da sie für ihren effizienten Import auf die Interaktion mit dem mitochondrialen Disulfid-Staffelsystem angewiesen sind. Seit der Entdeckung der Thioloxygenase Mia40 wurden zahlreiche Substrate dieses Systems gefunden. Bei den meisten dieser Substrate handelt es sich um eher kleine Proteine, im Bereich von ca. 10 kDa. Auffallend ist, dass die Struktur dieser Proteine sehr ähnlich zu der von Mia40 selbst ist und aus einer Helix-Schleife-Helix-Struktur mit zwei Disulfiden besteht (Abbildung 5 a). Diese Proteine lassen sich in zwei Untergruppen unterteilen, die sich dadurch unterscheiden, dass die vier Cysteine entweder als zwei CX₃C-, oder CX₉C-Motive angeordnet sind. Es konnten bisher fünf Vertreter der CX₃C-Proteine gefunden werden, die alle zur Familie der Tim-Proteine gehören (Milenkovic *et al.*, 2009; Webb *et al.*, 2006). Diese Proteine bilden nach der Faltung hexamere Komplexe aus und transportieren als Chaperone Substratproteine zur inneren Mitochondrienmembran. Die Gruppe der CX₉C-Substrate ist sehr viel größer. *In silico* konnten durch Sequenzanalyse 30 dieser Proteine gefunden werden (Longen *et al.*, 2009). Für einige von ihnen wurde die Interaktion mit Mia40 bereits experimentell nachgewiesen, wobei das am besten untersuchte dieser Proteine Cox17 ist. Cox17 ist ein Kupferchaperon des IMS, das für die Biogenese der Cytochrom c Oxidase wichtig ist. Es enthält zwei strukturelle Disulfide, sowie drei Cysteine, die an der Bindung von Kupferionen beteiligt sind (Arnesano *et al.*, 2005).

Zunehmend werden auch komplexer aufgebaute Substratproteine von Mia40, wie beispielsweise die Protease Atp23 (Weckbecker *et al.*, 2012), die Superoxiddismutase Sod1 (Gross *et al.*, 2011; Kloppel *et al.*, 2011; Varabyova *et al.*, 2013) und das Kupferchaperon Ccs1 (Gross *et al.*, 2011; Varabyova *et al.*, 2013) mit mehr als zwei Disulfiden identifiziert.

1.6 Das sliding-and-docking Modell

Die oxidative Faltung von Modellproteinen wie BPTI, RNase A, Hirudin oder Insulin ist gut untersucht. Durch Oxidoreduktasen, wie DsbA oder PDI, werden zunächst zufällige, nicht native Disulfide eingeführt, da präferentiell in der Primärsequenz benachbarte Cysteine miteinander reagieren (Creighton *et al.*, 1980; Sone *et al.*, 1997). Diese Disulfide müssen anschließend durch Isomerasen, wie DsbC, oder PDI, in den nativen Zustand überführt werden (Chakravarthi *et al.*, 2006; Gleiter & Bardwell, 2008). Es ist bisher noch nicht bekannt, ob auch Mia40 zunächst zufällige Disulfide einführt und eine Isomerasefunktion besitzt, um die korrekte Verbrückung zu erreichen. Es gibt jedoch Hinweise, dass GSH die Effizienz der Substratoxidation durch Mia40 verbessert, vermutlich durch Reduktion von kinetisch gefangenen Intermediaten (Bien *et al.*, 2010).

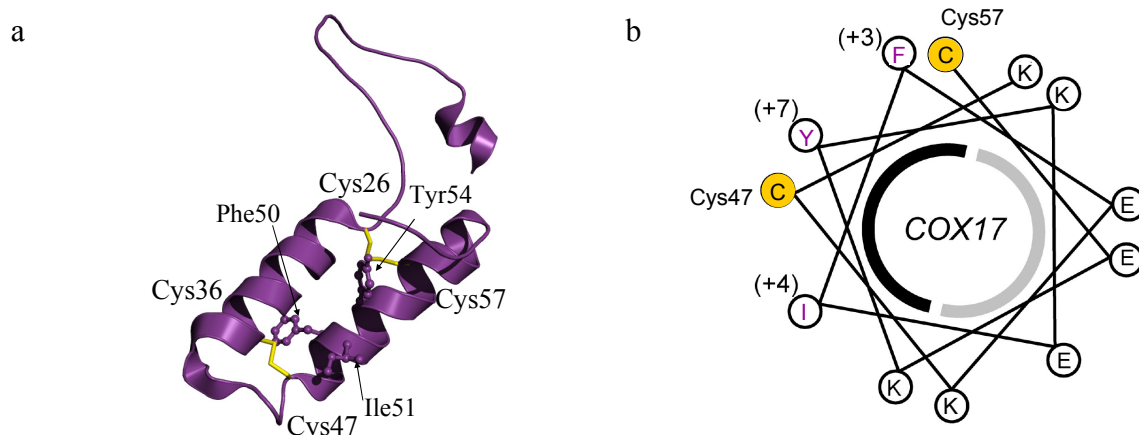


Abbildung 5: Struktur von Cox17. Gezeigt ist die Struktur von Cox17 aus *S. cerevisiae*. Die strukturellen Cysteine sind als gelbe Stäbchen dargestellt und gemäß der Aminosäuresequenz nummeriert. Die Reste der MISS/ITS-Sequenz (Phe50, Ile51, Tyr54) sind in *balls and sticks* Repräsentation dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol und dem pdb-Eintrag 1U97 erstellt. (b) Helixprojektion des zweiten CX₉C-Motivs (Aminosäuren 46-62) aus (a). Die Reste der MISS/ITS-Sequenz sind in magenta dargestellt. Die hydrophobe (schwarz) und hydrophile (grau) Seite der amphipatischen Helix sind als Halbkreise angedeutet. Die Abbildung wurde Sideris *et. al.*, 2009 entnommen und modifiziert.

Um korrekte Disulfide zu bilden, muss Mia40 selektiv mit bestimmten Cysteinen des Substrates gemischte Disulfide ausbilden und diese anschließend ausschließlich durch nukleophilen Angriff des korrekten Cysteins aus dem Substrat aufgelöst werden. Für die Substrate Tim9 und Cox17 wurden Signalsequenzen, die sogenannte MISS- (*mitochondria IMS sorting signal*) bzw. ITS-Sequenz (*IMS targeting signal*) gefunden, die die spezifische Reaktion von Cysteinen des Substrats mit Mia40 steuern sollen (Milenkovic *et al.*, 2009;

Sideris *et al.*, 2009). Hierbei handelt es sich um hydrophobe Aminosäuren, die jeweils eine bzw. zwei Helixwindungen entfernt von einem Cystein liegen (Abbildung 5 a). Es wurde vorgeschlagen, dass das Substrat bei Bindung an die hydrophobe Furche von Mia40 eine Helix ausbildet, in der diese hydrophoben Reste in die direkte Nachbarschaft des Cysteins gelangen und dieses dadurch in die unmittelbare Nähe des katalytischen Zentrums dirigieren (*sliding* Schritt, Abbildung 5 b) (Banci *et al.*, 2010; Sideris *et al.*, 2009). Auf diese Weise soll die Reaktion von Mia40 mit einem definierten Cystein des Substrats gesteuert werden (*docking* Schritt). Die MISS/ITS-Sequenz wurde durch Sequenzvergleich in den meisten der klassischen CX₃C- und CX₉C-Substrate von Mia40 gefunden (Longen *et al.*, 2009; Sideris *et al.*, 2009). In Cox17 liegt diese Sequenz in der C-terminalen Helix zwischen Cystein 3 und 4 und es wurde postuliert, dass auf diese Weise in humanem Cox17 das dritte Cystein (-CX₉C-CX₉C-) und in Hefe-Cox17 das vierte Cystein (-CX₉C-CX₉C) das initiale gemischte Disulfid mit Mia40 ausbildet. Dies würde jeweils zur Bildung der inneren (-CX₉C-CX₉C), bzw. der äußeren (-CX₉C-CX₉C) Disulfidbrücke führen. Warum in den homologen Proteinen unterschiedliche Cysteine an Mia40 angreifen, konnte nicht geklärt werden. Ebenso ist nicht bekannt, wie in Hefe das zweite Disulfid eingeführt wird, da durch initiale Bildung des äußeren Disulfids die MISS/ITS-Sequenz nicht mehr exponiert ist und damit die Interaktion mit Mia40 erschwert wäre. Eine mögliche Lösung hierfür wäre eine Oxidation der verbleibenden Cysteine durch Glutathion, oder O₂. Für strukturell einfach aufgebaute Substrate, wie die Helix-Schleife-Helix-Proteine, könnte die spezifische Ausbildung des initialen Intermediats, sowie eine Verknüpfung der Cysteine, die durch früh ausgebildete Helixstrukturen gesteuert wird ausreichen, um die Bildung fehlverbrückter Spezies zu verhindern. Da jedoch auch komplexer aufgebaute Substrate mit mehr als zwei Disulfiden gefunden wurden könnte der *sliding-and-docking* Mechanismus in diesen Fällen zu kurz greifen.

1.7 Problemstellung

Die zentralen Komponenten des mitochondrialen Disulfid-Staffelsystems, Mia40 und Erv1, und mehrere Substrate konnten seit seiner Entdeckung näher charakterisiert werden. Die Strukturen von Mia40 aus Mensch und Hefe wurden gelöst und zeigten, dass Mia40 keine strukturelle Ähnlichkeit zu den bisher bekannten Thioredoxin-artigen Oxidoreduktasen aufweist. Die Oxidation von Substraten wurde insbesondere anhand der Proteine Cox17 und Tim9 untersucht. Hierfür wurden sowohl zellbasierte Untersuchungen, als auch Importexperimente an isolierten Mitochondrien durchgeführt. Auch mit den isolierten Proteinen konnte die Substratoxidation *in vitro* nachgestellt werden.

Es zeigte sich, dass die Besonderheiten der Substratoxidation durch Mia40 die Bildung von sehr langlebigen gemischten Disulfiden und deren langsame Auflösung unter Freisetzung der oxidierten Proteine sind, sowie die spezifische Reaktion mit Cysteinen des Substrats, die

durch hydrophobe Signalsequenzen bestimmt werden. Dennoch ist der Reaktionsmechanismus von Mia40 auf molekularer Ebene weitgehend unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Katalysemechanismus der oxidativen Faltung des natürlichen Substrats Cox17 durch Mia40 besser zu verstehen. Zunächst wurde die Interaktion von Mia40 mit Cox17 über Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) untersucht und die Affinität und Substratspezifität von Mia40 analysiert. Es zeigte sich, dass eine hohe Dynamik der Bindung eine intrinsische Eigenschaft von Mia40 ist.

Im Anschluss an den nicht kovalenten Komplex bildet sich das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17. Das Cystein aus dem Substrat, das kovalent an Mia40 gebunden ist, bestimmt, welches Disulfid im Substrat gebildet wird. Dieser Schritt ist daher von besonderer Bedeutung für die Katalyse und aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob Mia40 präferenziell mit bestimmten Cysteinen des Substrats reagiert und wie die lokale Umgebung der Cysteine die Reaktivität beeinflusst. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass hydrophobe Reste in der direkten Umgebung der Cysteine die Reaktivität erhöhen.

Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Eigenschaft von Mia40 ungewöhnlich langlebige Disulfide mit den Substraten auszubilden. In diesem Punkt unterscheidet sich Mia40 deutlich von den Thiooxidin-artigen Oxidoreduktasen, wie PDI und DsbA, für die keine kovalenten Enzym-Substrat-Komplexe isoliert werden können. Um Hinweise darauf zu finden, weshalb die gemischten Disulfide langlebig sind und wie dies mit der biologischen Funktion von Mia40 zusammenhängt, wurde das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17 isoliert und eingehend charakterisiert. Als molekulare Ursache für die Langlebigkeit des kovalenten Komplexes wurde eine Stabilisierung durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Mia40 und Cox17 gefunden.

Schließlich war es ein wichtiges Ziel dieser Arbeit herauszufinden, auf welche Weise die beiden Disulfide durch Mia40 in Cox17 eingeführt werden und wie die oxidative und die konformationelle Faltung des Substrats gekoppelt sind. Hierfür wurden Cox17-Varianten mit unterschiedlicher Anzahl und Anordnung von Disulfiden verwendet. Die Charakterisierung der Oxidation dieser Varianten durch Mia40 führte zur Aufstellung eines Modells für den Mechanismus der Substratoxidation durch Mia40. In diesem Modell kommt es durch Kombination aus der gerichteten Ausbildung des initialen gemischten Disulfids und der kinetische Kontrolle der folgenden Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen zur Freisetzung einer teiloxidierten Cox17-Spezies mit einer bestimmten, nativen Disulfidbrücke. In einer nachfolgenden Reaktion mit Mia40 wird das zweite native Disulfid in dieses Intermediat eingeführt. Das freigesetzte, nativ gefaltete Cox17 wird schließlich dem Katalysegleichgewicht entzogen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

<i>E. coli</i> XL1 Blue:	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3):	<i>E. coli</i> B, F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ</i> (DE3)
<i>E. coli</i> Origami B (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacY1 aphC</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Kan ^R , Tet ^R)

Der *E. coli*-Stamm XL1 Blue wurde zur Produktion von Plasmid-DNA, der *E. coli*-Stamm Origami B zur Expression der Mia40-Varianten und der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) zur Expression aller weiteren Proteine verwendet. Als Vektoren für die Klonierung und Expression der Proteinvarianten wurde das Plasmid pET11a (Amp^R NOVAGEN, Madison, USA) verwendet, wobei die klonierten Gene unter Kontrolle eines T7-Promotors stehen.

2.1.2 Nährmedien

dYT-Medium:	16 g/l Pepton aus Casein, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
Nährböden:	dYT-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar

Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (120 °C, 20 min, 2 bar) sterilisiert. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Stammlösungen zugegeben (Amp: 300 µg/ml, Km: 50 µg/ml, Tet: 10 µg/ml).

2.1.3 Enzyme, Proteine und DNA-Standards

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (6 U/µl)	Stephanie Hoffmann-Thoms (Bayreuth, D)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/µl)	Thermo Scientific (Erlangen, D)
T4-DNA-Ligase (1 Weiss U/µl)	
T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)	
PageRuler TM Proteinstandard	
<i>DpnI</i> , <i>BamHI</i> , <i>NdeI</i> , <i>KpnI</i> , <i>BsaI</i> , <i>XhoI</i> (20 U/µl)	
α-Lactalbumin, RNase A	Sigma Aldrich (Deisenhofen, D)
<i>Sentrin-specific protease 2</i> (Senp 2)	J. Koch, P. Schmidpeter (Bayreuth, D)
λ-DNA/ <i>Eco</i> 130 I: 421-19329 bp	MBI FERMENTAS (Vilnius, LT)
bp-Leiter: 100-1500 bp	Genaxxon (Ulm, D)

2.1.4 Oligodesoxyribonukleotide

Die zur Klonierung und Mutagenese der Protein-Varianten verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe, D) und Microsynth (Balgach, Ch) bezogen und sind in Tabelle S 1 aufgeführt.

2.1.5 Chemikalien

Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG), Harnstoff	Gerbü (Gaiberg, D)
5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure (1,5-IAEDANS)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Guanidiniumchlorid (ultra pure)	MP (Biomedicals, Irvine, USA)
Adenosin-5'-Triphosphat, Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin, Imidazol, Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth (Karlsruhe, D)
Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamidlösung (37,5:1 "Rotiphorese 30"), Dithiotreitol (DTT)	
5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB),	
Desoxyribonukleotide, Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA), Ethidiumbromid, Glutathion ox. (GSSG),	
Glutathion red. (GSH), Glycin,	
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED), N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin),	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris),	
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid (TCEP),	
Agarose, Ammoniumpersulfat (APS),	Serva (Heidelberg, D)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	
Bromphenolblau, Silica (S-5631), 2'3'-cCMP,	Sigma Aldrich (Deisenhofen, D)
Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD)	
Natriumiodacetat, Natriumiodacetamid	
Proteaseinhibitor cOmplete ULTRA Tablets	Roche Diagnostics (Mannheim, D)

Alle weiteren Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. von der Firma Grüssing (Filsum, D) bezogen. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde mit einer Seralpur-Reinstwasseranlage deionisiert (ddH₂O, Leitfähigkeit < 0,1 μ S/cm). Puffer für spektroskopische Messungen wurden durch 0,45 μ m-Nylonfilter filtriert und vor Gebrauch mindestens 30 min entgast.

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Ni-NTA-Superflow-Agarose-Säule (5 ml)	Qiagen (Hilden, D)
NAP-5 und -10 Säulen (Sephadex G-25 DNA-grade),	GE Healthcare (Freiburg, D)

Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex 75 (26/600 prep grade),	GE Healthcare (Freiburg, D)
Konzentratoren Amicon Ultra-15 (3 kDa Ausschluss),	Millipore (Carrigtwohill, Ireland)
Millipore Filter Typ VS 0,025 µm	
Spectropor Dialyseschläuche (> 3,5 kDa)	Spectrum (Los Angeles, USA)
Rotilabor Spritzenfilter (0,45; 0,2 µm)	Sarstedt (Nünrebrecht, D)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit,	Peqlab (Erlangen, D)
peqGOLD Cycle-Pure Kit	

2.1.7 Geräte

DX.17MV <i>sequential</i> <i>stopped-flow</i> -Fluoreszenzspektrophotometer	Applied Photophysics, (Leatherhead, GB)
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B <i>plus</i>	Du Pont (Bad Homburg, D)
Rotoren GS-3 und SS-34	
Zentrifuge 5415 R, Mastercycler Gradient, Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, D)
FPLC-Anlage, ÄKTA-FPLC (academic edition),	GE Healthcare (Freiburg, D)
Vertikalelektrophoresekkammer 2050 MIDGET und Netzgerät 2301 Macro	
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil	Hellma (Mühlheim, D)
Laborfuge 400 R	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle (Wehingen, D)
Refraktometer	Krüss (Hamburg, D)
Microfluidizer M-110L	Microfluidics (Newton, USA)
Thermocycler PTC 100	MJ Research (Watertown, USA)
Environmental incubator shaker G24, Innova 3000, incubator shaker C24	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Easyject Prima Elektroporationsapparatur	Peqlab (Erlangen, D)
E-Box VX Geldokumentationssystem	
Laborwaage L610D, Analysenwaage R200D	Sartorius (Göttingen, D)
Wasseraufbereitung: Seralpur pro 90 CN	Seral (Ransbach, D)
UV/VIS-Dioden-Array Spectrometer 8452A	Hewlett-Packard (Waldbronn, D)
Spektropolarimeter Jasco J-600 und J-710	Jasco (Groß-Umstadt, D)
Peltierelement PTC-348WI	
Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer FP-6500	
UV/Vis-Spektrophotometer: Cary 100 Bio	Varian (Darmstadt, D)
Mikroprozessor pH-Meter: WTW pH 537	WTW (Weilheim, D)

2.1.8 Computerprogramme

BioEdit	Hall, T. (Ibis Therapeutics, USA)
Grafit 3.0 / 5.0	Erithacus (Middlesex, UK)
PyMol	DeLanoScientific (San Francisco, USA)
Scientist 2.01	Micromath (St. Louis, USA)
DynaFit 3	Kuzmic P. (BioKin, Watertown, USA), (Kuzmic, 2009)
ImageJ	Rasband W. (NIH) (Abramoff M.D., 2004)
Origin 5.0	MicroCal Software INC (Northampton, MA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Gelelektrophoretische Methoden

2.2.1.1 Agarose Gelelektrophorese

TAE-Puffer:	20 mM Tris/HCl pH ^{20 °C} 8,0, 10 mM Eisessig, 0,5 mM EDTA
Probenpuffer:	4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer	TAE-Puffer
Färbelösung:	TAE-Puffer, ca. 2 µg/ml Ethidiumbromid
Entfärbelösung:	TAE-Puffer

DNA-Fragmente (< 1 kb) wurden in Gelen mit 1,6 % (w/v) Agarose, größere DNA-Fragmente in Gelen mit 0,6 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgetrennt. Die Proben wurden mit 1/6 Probenvolumen Probenpuffer gemischt. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte für 16 min in einer horizontalen Elektrophoresekammer in TAE-Puffer bei 125 V (Feldstärke: 6 V/cm Elektrodenabstand). Das Gel wurde 10 min in Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt, kurz in Entfärbelösung entfärbt und die Fluoreszenz von Ethidiumbromid ($\lambda = 302 \text{ nm}$) detektiert.

2.2.1.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel:	12,5 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 37,5:1 Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid), 1 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,45, 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgel	4,4 % (w/v) Acrylamid (s.o.), 0,75 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,45, 0,07% (w/v) SDS
Probenpuffer (4x):	200 mM Tris/HCl, pH ^{RT} 8,0, 40 mM EDTA, 48 % (v/v) Glycerin, 1,5 % (w/v) SDS, Spuren von Bromphenolblau
Anoden-Puffer:	200 mM Tris/HCl, pH ^{RT} 8,9

Kathoden-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH ^{RT} 8,2, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS
Färbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blue G
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schagger & von Jagow ist durch die Verwendung von Tricin als Folgeion eine gute Methode um kleine Proteine, im Bereich zwischen 5 und 20 kDa, zu trennen (Schagger & von Jagow, 1987). Die Proben wurden mit ¼ Volumen Probenpuffer, der bei SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zusätzlich 150 mM DTT enthielt, versetzt. Die Elektrophorese wurde in einer MIDGET-Vertikalelektrophoreseapparatur bei 7 °C durchgeführt. Für das Sammelgel wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt, zum Auftrennen der Proteine im Trenngel wurde die Stromstärke auf 45 mA erhöht. Zum Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel kurz in Färbelösung aufgekocht und 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung erhitzt und mehrere Stunden lang entfärbt.

2.2.1.3 Nicht denaturierende Gelelektrophorese (Native PAGE)

Sammelgel	3 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 37,5:1 Acrylamid/N,N' - Methylenbisacrylamid), 0,5 M Tris/HCl, pH ^{RT} 6,8
Trenngel:	20 % (w/v) Acrylamid (s.o.), 0,5 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,9
Probenpuffer (4x):	0,2 M Tris/HCl, pH ^{RT} 6,8, 48 % (w/v) Glycerin, Spuren von Bromphenolblau
Anoden-Puffer:	0,2 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,9
Kathoden-Puffer:	0,05 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,9, 0,38 M Glycin
Färbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blue G
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure

Bei der nativen PAGE werden Proteine im Gegensatz zur SDS-PAGE sowohl nach Größe, als auch nach Ladung getrennt (Ornstein, 1964). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit ¼ Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Midget 2050-Vertikalelektrophoresekammer bei 7 °C, wobei die Stromstärke während der Elektrophorese 25 mA betrug. Zum Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel kurz in Färbelösung aufgekocht und 20 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung erhitzt und mehrere Stunden lang entfärbt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Klonierung von Genen in den Expressionsvektor

Pfu-Puffer (10x): 200 mM Tris/HCl pH^{RT} 8,8, 100 mM (NH₄)₂SO₄,
20 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 1 % (w/v)
Triton X-100

Fast-Digest-Puffer (10x) (Fermentas)

T4-DNA-Ligase Puffer (10x): 400 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂,
100 mM DTT, 5 mM ATP

Der Expressionsvektor pET11a wurde aus 4 ml einer *E. coli* XL1 Blue Kultur mit Hilfe eines *peqGOLD Plasmid Miniprep Kits* isoliert. Das gewünschte Gen wurde mittels PCR aus genomischer Hefe-DNA, das SUMO-Gen aus einem entsprechenden Plasmid amplifiziert. Für diese PCR wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet, da diese Polymerase im Gegensatz zur fehleranfälligeren *Taq*-Polymerase eine 3'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Die PCR erfolgte in 50 µl-Ansätzen mit 38 µl ddH₂O, 5 µl *Pfu*-Puffer (10x), 2 µM 10 mM dNTPs, je 2 µl 10 µM *forward* und *reverse Primer*, 1 µl Matrize und 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (3 U). Nach dem Erhitzen der Ansätze im Thermocycler auf 95 °C (2 min), wurde das gewünschte Fragment innerhalb von 30 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus dem Aufschmelzen der Stränge (95 °C, 30 s), der *Primer*-Anlagerung (50 °C, 30 s) und der DNA-Synthese (72 °C, Dauer abhängig von Fragmentlänge). Unvollständige Amplifikate wurden in einem abschließenden Schritt (72 °C, 10 min) vervollständigt. Die PCR-Produkte wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.1) überprüft und mit Hilfe des *peqGOLD Cycle-Pure Kit* gereinigt.

Die Genfragmente und der Vektor wurden mit den gewünschten Restriktionsenzymen geschnitten. Hierzu wurden 26 µl ungeschnittene DNA mit 3 µl 10x Fast-Digest-Puffer und jeweils 1,5 µl der Restriktionsenzyme 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die geschnittenen DNA-Fragmente mit dem *peqGOLD Cycle-Pure Kit* gereinigt.

Für die abschließende Ligation der Gene und des Vektors wurden 3 µl geschnittener Vektor, je 10 µl geschnittenes Fragment, 3 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 Weiss U) 1 h bei 22 °C inkubiert. *E. coli* XL1 Blue Zellen wurden mit den erhaltenen Plasmiden transformiert (2.2.2.3) und der Erfolg der Klonierung durch Kolonie-PCR überprüft (2.2.2.4).

2.2.2.2 Einführung von Mutationen durch *blunt-end* Mutagenese

T4-PNK-Puffer (10x): 70 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 50 mM DTT
 T4-DNA-Ligase-Puffer (10x): 400 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT,
 5 mM ATP

Mit Hilfe der *blunt-end* Mutagenese ist es möglich, Mutationen oder ein zusätzliches DNA-Fragment in zyklische DNA-Moleküle einzuführen. Infolge der gegenläufigen *Primer* wird das gesamte Plasmid als lineares Fragment vervielfältigt. Die PCR erfolgte unter den in 2.2.2.1 angegebenen Bedingungen mit 3 U *Pfu*-Polymerase, wobei eine Polymerisationszeit von 2 min pro kb DNA-Länge gewählt wurde.

Um das lineare Fragment zu zyklisieren, wurden die 5'-Enden phosphoryliert. Dafür wurde zu 24 µl linearer DNA 3 µl 10 mM ATP, 3 µl T4-PNK-Puffer (10x) und 1 µl T4-PNK (10 U/µl) gegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10x) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) zugegeben und weitere 2 h bei 22 °C inkubiert. Die Ligase wurde bei 70 °C 15 min lang inaktiviert. Da die *Template*-DNA, im Gegensatz zu *in vitro* synthetisierter mutierter DNA, methyliert vorliegt, kann sie spezifisch durch Inkubation mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* geschnitten werden. *DpnI* besitzt eine Erkennungssequenz aus vier Basen, welche ein methyliertes Adenin enthält, und ist daher für methylierte und hemimethylierte DNA spezifisch. Um die Matrize zu schneiden wurde 1 µl *DpnI* zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. *E. coli* XL1 Blue Zellen wurden mit den erhaltenen Plasmiden transformiert (2.2.2.3).

2.2.2.3 Herstellung und Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Präparation der Zellen wurden 500 ml dYT-Medium mit 2 ml einer ÜNK der entsprechenden *E. coli*-Zellen angeimpft und im Schüttler bei 30 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend pelletiert (6 000 rpm, 10 min, 4 °C, GS-3). Das Zellpellet wurde auf Eis mit 500 ml ddH₂O gewaschen und erneut pelletiert (s.o.). Der Waschschritt wurde mit 250 ml 10 % (v/v) Glycerin wiederholt. Danach wurde das Pellet in 10 ml 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und die Zellen nochmals zentrifugiert (6 000 rpm, 10 min, 4 °C, SS34). Abschließend wurden die Zellen in 1,5 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, auf 40 µl-Aliquots verteilt und bei -80 °C gelagert. Während der gesamten Präparation war darauf zu achten, dass die Zellen ständig auf Eis gelagert wurden und die verwendeten Lösungen ausreichend gekühlt waren.

Für die Transformation wurde die DNA in einer 10-minütigen Mikrodialyse gegen ddH₂O entsalzt. Ein Aliquot der jeweiligen *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, die DNA zugegeben und in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte durch einen Spannungspuls von 2500 V. Die transformierten Zellen wurden sofort in dYT-Medium aufgenommen und die Zellsuspension auf einer dYT-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Amp: 300 µg/ml, Km: 50 µg/ml, Tet: 10 µg/ml) ausplattiert.

Infolgedessen konnten nur transformierte Zellen, mit der durch den jeweiligen pET-Vektor erworbenen Antibiotikum-Resistenz, wachsen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Kolonie-PCR

Taq-Puffer (10x): 20 mM Tris/HCl pH^{25 °C} 9,0, 50 mM KCl, 0,1 % (w/v) TritonX-100

Bei der Kolonie-PCR wird DNA aus Bakterienkolonien als Matrize verwendet. Hierdurch wird überprüft, ob die Klone die gewünschte DNA-Sequenz enthalten. Da die PCR nur zur Analyse eingesetzt wird, ist eine 3'-Exonukleaseaktivität nicht notwendig und es kann die robustere *Taq*-DNA-Polymerase verwendet werden.

Als *Primer* für die klonierten DNA-Fragmente wurde das flankierende Oligodesoxyribonukleotid T7-Promotor und ein entsprechender gegenläufiger genspezifischer *Primer* verwendet. Für 16 PCR-Ansätze wurde eine 200 µl PCR-Stammlösung aus 20 µl *Taq*-Puffer (10x), 20 µl 25 mM MgCl₂, je 8 µl 10 µM *Primern*, 8 µl 10 mM dNTPs, 4 µl *Taq*-DNA-Polymerase (6 U/µl) und 132 µl ddH₂O hergestellt. Jeder Ansatz (10 µl) wurde mit einer einzelnen Kolonie inokuliert. Mit dem restlichen Zellmaterial wurde zum Anlegen einer Übernachtskultur (ÜNK) 50 µl dYT-Medium angeimpft. Die Dauer der Polymerisation war von der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhängig. Der Erfolg der Kolonie-PCR wurde über Agarose-Gelelektrophorese überprüft (2.2.1.1).

2.2.3 Fermentation und Reinigung der Protein-Varianten

Für alle durchgeführten Experimente wurde eine verkürzte Variante von Mia40 aus *S. cerevisiae* (Reste 284-403) verwendet, die vereinfacht im Weiteren als Mia40 bezeichnet wird. In Cox17, ebenfalls aus *S. cerevisiae*, wurden die Cu⁺ bindenden Cysteine an den Positionen 16, 23 und 24 gegen Serine ausgetauscht. Diese Variante wird im Folgenden als Cox17* bezeichnet.

2.2.3.1 Test auf Überexpression eines Proteins

Um die Überexpression der Protein-Varianten zu überprüfen, wurden 5 ml dYT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (300 µg/ml Amp, 50 µg/ml Km, 10 µg/ml Tet) und *E. coli* BL21(DE3)-, oder Origami B-Zellen, die mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert waren, angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 inkubiert. Als nicht induzierte Referenz wurde ein Volumen entsprechend einer OD₆₀₀ von eins entnommen und die Zellen pelletiert. Um die Überexpression der Protein-Varianten zu induzieren, wurde der Rest der Kultur mit 1 mM IPTG versetzt. Nach vierstündiger Inkubation wurde erneut ein Volumen mit einer OD₆₀₀ von eins entnommen und abzentrifugiert. Die Proben wurden in 10 µl 4x Probenpuffer und 30 µl ddH₂O gelöst. Mit Hilfe einer SDS-PAGE (2.2.1.2) wurde

durch Vergleich der Bandenintensität der nicht induzierten Referenz und der induzierten Probe die Überexpression überprüft.

2.2.3.2 Fermentation der Proteinvarianten

Lyse-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM DTT

Das autoklavierte Kulturmedium (dYT) wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (Amp: 300 µg/ml, Km: 50 µg/ml, Tet: 10 µg/ml) und je 500 ml Kulturmedium mit 4 ml der entsprechenden *E. coli*-ÜNK angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Zur Expression des Proteins wurde in den Zellen durch Zugabe von 1 mM IPTG die Induktion der T7-RNA-Polymerase ausgelöst. Auf diese Weise konnte zum einen die Expression der Proteine vor Induktion weitgehend unterdrückt und zum anderen ein sehr hohes Expressionsniveau erreicht werden (Studier *et al.*, 1990). Zur Produktion von Mia40 wurde weitere 60 min bei 30 °C, für alle weiteren Proteine weitere 4 h bei 37 °C fermentiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 000 rpm, 10 min, 4 °C, GS-3), das Pellet in 10 ml Lyse-Puffer pro Liter eingesetztem Kulturmedium aufgenommen und bis zum Aufschluss bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Allgemeine Reinigungsschritte

Alle Proteine wurden cytoplasmatisch exprimiert. Mia40, Cox17 und Erv1 waren N-terminal mit dem SUMO-Protein Smt3 aus *S. cerevisiae*, DsbA und PDI mit einem Hexahistidin-*tag* verknüpft. Das SUMO-Protein besitzt einen N-terminalen His₆-*tag*, worüber die Proteine durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus dem Überstand nach dem Zellaufschluss gereinigt werden können. Durch Abspaltung des SUMO-His₆-tags und anschließende Gelfiltrationschromatographie können die Proteine in nativer Form erhalten werden.

2.2.3.3.1 Zellaufschluss

Vor dem Zellaufschluss wurde die aufgetaute Zellsuspension gerührt. Im Fall von Mia40 und Erv1 wurde zusätzlich eine Proteaseinhibitor-Tablette zugegeben. Die Zellsuspension wurde mit einem Microfluidizer M-110L aufgeschlossen. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation pelletiert (16 000 rpm, 20 min, 4 °C, SS-34) und der Überstand filtriert (Rotilabor Spritzenfilter, 0,45 µm).

2.2.3.3.2 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Puffer A: 50 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 10 mM Imidazol

Puffer B: 50 mM Kaliumphosphat, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,8, 500 mM Imidazol

Die Proteinlösung wurde mit 20 mM MgCl₂ versetzt, um freies EDTA zu binden. Die jeweiligen Proteine wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/min auf eine Ni-NTA-

Säule (5 ml Säulenvolumen), die zuvor mit Puffer A äquilibriert worden war, aufgetragen. Schwach bindende Proteine wurden durch Waschen mit 100 ml Puffer A entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM. Die ersten 5 ml, das Totvolumen der Säule, wurden verworfen und anschließend 20 ml des Eluates mit dem gewünschten Protein gesammelt. Nach der Elution wurde die Säule mit 15 ml Puffer B und abschließend mit ddH₂O gespült. Anhand der Absorption bei 280 nm wurde die Konzentration des Fusionsproteins bestimmt.

2.2.3.3.3 Proteolyse des SUMO-Proteins und erneute Affinitätschromatographie

Das Fusionsprotein wurde in einem Dialyseschlauch (3,5 kDa Ausschluss) zusammen mit einer geeigneten Menge der SUMO-Protease Senp2 (1 mg Protease spaltet 150 mg Substrat) bei 4 °C gegen 2 l Puffer A ohne Imidazol über Nacht dialysiert. Während der Dialyse wurde das Imidazol entfernt und das gewünschte Protein durch die Protease von dem SUMO-Protein abgespalten. Senp2 besitzt wie das SUMO-Protein einen His₆-tag und kann somit über eine erneute Ni-NTA-Affinitätschromatographie von dem gewünschten Protein abgetrennt werden. Die Affinitätschromatographie erfolgte wie unter 2.2.3.3.2 beschrieben. Allerdings wurde bei diesem Reinigungsschritt der Durchbruch gesammelt, der das gewünschte tag-freie Protein beinhaltete. Anschließend wurden mit 5 Säulenvolumina Puffer B Senp2 und das SUMO-Protein von der Säule eluiert.

2.2.3.3.4 Gelfiltrationschromatographie

GC-Puffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4

Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde konzentriert und mittels einer HighLoad Superdex 75 prep-grade (26/600 prep grade) Gelfiltrationschromatographiesäule weiter gereinigt. Die Säule wurde zunächst in GC-Puffer äquilibriert, 5 ml Proteinlösung aufgetragen und schließlich das Protein bei einer Flussrate von 2,5 ml/min mit GC-Puffer eluiert. Das Eluat wurde über einen geeigneten Zeitraum in 2,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Detektion des Proteins erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm. Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltrationschromatographie wurden mit Hilfe von Konzentratoren (Amicon Ultra) mit einem Ausschlussgewicht von 3 kDa konzentriert.

2.2.3.4 Spezielle Reinigungsschritte

2.2.3.4.1 Oxidation von SUMO-Mia40

Oxidationspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH^{5 °C} 8,0

Obwohl die Mia40-Varianten in Origami B-Zellen mit oxidierendem Cytosol exprimiert wurden, lag ein großer Teil der katalytischen Disulfide reduziert vor, was in den folgenden

Reinigungsschritten zur Ausbildung von kovalenten Dimeren führte. Um vollständig oxidiertes Protein zu erhalten, wurde Mia40 mit der Sulfhydryloxidase Erv1 inkubiert. Hierzu wurden ca. 30 ml des Überstandes nach dem Zellaufschluss langsam in 150 ml Oxidationspuffer, der 50 nM Erv1 enthielt, getropft und unter Kühlung ca. 5 h lang gerührt. Anschließend wurde wie ab 2.2.3.3.2 beschrieben die Ni-NTA-Affinitätschromatographie und alle weiteren Reinigungsschritte durchgeführt.

2.2.3.4.2 Rekonstitution des Komplexes von Erv1 und FAD

Erv1 bildet einen stöchiometrischen Komplex mit dem Kofaktor FAD. Während der heterologen Expression von Erv1 in *E. coli* konnte keine vollständige Sättigung mit FAD erreicht werden. Daher wurde das Protein wie ab 2.2.3.3.1 beschrieben gereinigt und das Eluat der zweiten Ni-NTA-Chromatographie mit einen fünffachen Überschuss an FAD über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges FAD durch eine Gelfiltrationschromatographie entfernt.

2.2.3.4.3 Oxidative Rückfaltung von Cox17*

Reduktionspuffer 0,1 M Tris/HCl, 6M GdmCl, 1 mM EDTA, pH^{RT} 8,0, 5mM GSH

Rückfaltungspuffer 0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH^{RT} 8,5, 2 mM GSSG

Während der Reinigung von Cox17* bilden sich falsch verbrückte Spezies aus. Um diese nicht nativen Disulfide zu reduzieren wurde das Cox17*-SUMO-Fusionsprotein nach der ersten Ni-NTA-Affinitätschromatographie auf 1 ml konzentriert und in 14 ml Reduktionspuffer mindestens 2 h lang reduziert. Danach wurde der Ansatz in 135 ml Rückfaltungspuffer unter Rühren mit einer Flussrate von 0,5 ml/min verdünnt. Das Protein wurde über Nacht bei Raumtemperatur oxidiert. Der Oxidationsansatz wurde über eine weitere Ni-NTA-Säule konzentriert und die Abspaltung des SUMO-tags und alle weiteren Reinigungsschritte wie ab 2.2.3.3.3 beschrieben durchgeführt.

2.2.3.4.4 Reinigung von DsbA und PDI

DsbA aus *E. coli* und PDI aus *S. cerevisiae* wurden mit einem N-terminalen His₆-Tag exprimiert. Zur Reinigung dieser Proteine wurde eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltrationschromatographie, wie unter 2.2.3.3.2 und 2.2.3.3.4 beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Modifikation von Proteinen

2.2.4.1 Markierung von Mia40 und Cox17* mit IAEDANS

Markierungspuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 1 mM EDTA

Eine katalytisch inaktive Form von Mia40 mit den Mutationen C296S und W294F, sowie Cox17*-Varianten, die nur je eines der vier Cysteine enthielten, wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff IAEDANS (5-(((2-Iodacetyl)amino)ethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure) markiert. Die kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit dem Protein erfolgt über eine S_N2-Reaktion, wobei Iodid aus dem Iodacetamidderivat als Abgangsgruppe dient und nukleophil durch das Thiolat des Cysteins ersetzt wird.

Für die Markierung wurde das zu markierende Protein in Markierungspuffer verdünnt, 2 mM TCEP zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde zu Mia40 ein 1,5-facher und zu Cox17* ein 5-facher molarer Überschuss an IAEDANS zugegeben und bei 15 °C 60 min bzw. 45 min lang im Dunkeln inkubiert. Überschüssiger Fluoreszenzfarbstoff wurde durch zweimaliges Passieren einer NAPTM 5- bzw. NAPTM 10-Säule entfernt. Die Konzentration des markierten Proteins und die Markierungseffizienz wurden an Hand der Absorptionen bei 280 und 336 nm bestimmt.

2.2.4.2 Herstellung reduzierter Proteine

Reduktionspuffer1: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 5 mM DTT

Reduktionspuffer2: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 3 M GdmCl, 50 mM DTT

Elutionspuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 1 mM EDTA

Neben dem katalytischen Disulfid besitzt Mia40 noch zwei weitere, strukturelle Disulfide. Diese sind sehr viel stabiler, als das katalytische Disulfid, so dass letzteres unter milden Bedingungen selektiv reduziert werden kann. Mia40 wurde in Reduktionspuffer1 2 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Cox17* und RNase A wurden 90 min lang in Reduktionspuffer2 bei 25 °C inkubiert. Das Reduktions bzw. Denaturierungsmittel wurde durch zweimaliges Passieren einer NAPTM 5- bzw. NAPTM 10-Säule entfernt, wobei die Lösungen gut gekühlt wurden und die Elution durch stickstoffgesättigten Elutionspuffer erfolgte. Der Erfolg der Reduktion wurde durch nicht denaturierende PAGE (2.2.1.3) überprüft. Reduziertes Mia40, Cox17* und RNase A wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3 Herstellung von RCM- α -Lactalbumin

Reduktionspuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 3 M GdmCl, 20 mM TCEP

Elutionspuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA

α -Lactalbumin wurde in Reduktionspuffer 90 min lang bei 25 °C reduziert. Anschließend wurde 10 mM Iodacetat, gelöst in Reduktionspuffer, zugegeben und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Abtrennung von Iodacetat, GdmCl und TCEP, sowie die Lagerung erfolgte wie unter 2.2.4.2 beschrieben.

2.2.4.4 Herstellung von fehlverbrücktem Cox17*

Oxidationspuffer: 100 mM Kaliumphosphat, 3 M GdmCl, 1 mM EDTA, pH 7,4,
5 mM GSSG

Elutionspuffer: 100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4

Reduziertes Cox17* (2.2.4.2) wurde in Oxidationspuffer über Nacht bei Raumtemperatur im denaturierten Zustand oxidiert. Oxidations- und Denaturierungsmittel wurden durch Passieren von zwei NAPTM 5- bzw. NAPTM 10-Säulen mit Elutionspuffer abgetrennt.

2.2.4.5 Reinigung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17*_{1Cys}

GC-Puffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

Es wurden äquimolare Mengen Mia40 und Cox17*_{1Cys}-Varianten in GC-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM Iodacetat gestoppt und das gemischte Disulfid durch Gelfiltrationschromatographie von den monomeren Spezies getrennt. Die Fraktionen mit gemischtem Disulfid wurden konzentriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Spektroskopische Charakterisierung

2.2.5.1 Probenvorbereitung und Konzentrationsbestimmung

Das Protein wurde durch Gelfiltrationschromatographie über eine NAPTM 10-Säule in den Messpuffer überführt und eventuell vorhandenes Aggregat durch Zentrifugation (13 000 rpm, 4 °C, ca. 30 min) abgetrennt. Absorptionsspektren wurden von 240 nm bis 350 nm bzw. im Fall von Erv1 von 240 nm bis 500 nm an einem Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer aufgenommen. Die Absorptionsspektren wurden mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 100 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Die Konzentration der Proteinlösung wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Für AEDANS-markierte Proteine konnte der Grad der Markierung aus den relativen Konzentrationen an AEDANS (berechnet aus der Absorption bei 336 nm) und an Protein

(berechnet aus der Absorption bei 280 nm) bestimmt werden. Hierbei wurde die Absorption des Farbstoffs bei 280 nm berücksichtigt. Ebenso konnte die FAD-Sättigung von Erv1 durch die Absorption des Kofaktors bei 460 nm berechnet werden. Folgende Extinktionskoeffizienten wurden für die verschiedenen Protein-Varianten mit Hilfe des Programmes ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) bestimmt.

Mia40	$\epsilon_{280} = 11835 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Mia40 mit reduziertem/fehlendem katalytischen Disulfid	$\epsilon_{280} = 11710 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Mia40 _{C296SW294F}	$\epsilon_{257} = 6210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Cox17*	$\epsilon_{280} = 3230 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Cox17*F50W	$\epsilon_{280} = 8730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Cox17* reduziert	$\epsilon_{280} = 2980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Cox17* mit einem Disulfid	$\epsilon_{280} = 3105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Erv1	$\epsilon_{280} = 42315 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
FAD (gebunden)	$\epsilon_{280} = 18342 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\epsilon_{460} = 11900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
α -Lactalbumin	$\epsilon_{280} = 27880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
DsbA	$\epsilon_{280} = 23045 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
AEDANS	$\epsilon_{336} = 5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\epsilon_{280} = 880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
PDI	$\epsilon_{280} = 49655 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
RNase A	$\epsilon_{278} = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2.2.5.2 Circulardichroismusspektren

Messpuffer: 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

CD-Spektren wurden an einem Jasco J-600 bzw. J-710 Spektropolarimeter mit temperierbaren Küvetten aufgenommen. Die Schrittweite während der Messung betrug 0,2 nm, die Messgeschwindigkeit 50 nm min⁻¹, die Bandbreite 1 nm und die Dämpfung 2 s. Die Spektren wurden zehnmal gemessen und gemittelt.

Fern-UV-CD-Spektren wurden von 180 bis 260 nm gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 4 μM , die Schichtdicke 0,1 cm. Nach Korrektur um das Pufferspektrum wurden die Spektren auf die molare Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRW}}$ pro Aminosäure normiert (Gleichung 1).

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}} \cdot 10} \quad \text{Gleichung 1}$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$: molare Elliptizität pro Aminosäure in Grad cm² dmol⁻¹, Θ : gemessene Elliptizität in mGrad, c: Proteinkonzentration in M, d: Schichtdicke in cm, N_{AS} : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

2.2.5.3 Fluoreszenzspektren

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA

Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer in 1 cm Fluoreszenzrührküvetten bei 15 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei Wellenlängen von 280, 295 oder 336 nm mit einer Bandbreite von 3 nm. Die Emission wurde mit einer Bandbreite von 5 nm und einer Messgeschwindigkeit von 120 nm min⁻¹ (Dämpfung 0,5 s) gemessen. Die Spektren wurden jeweils um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

2.2.5.4 Absorptionsspektren

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA

Absorptionsspektren von 50 µM DTNB wurden in Messpuffer mit und ohne 10 mM TCEP an einem Hewlett-Packard UV/VIS-Dioden-Array Spectrometer 8452A in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen.

2.2.6 Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4,

Die thermische Denaturierung von Mia40 und Cox17 und den gemischten Disulfiden aus Mia40 und Cox17 wurde anhand des CD-Signals bei 222 nm an einem Jasco J-600 bzw. J-710 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltier-Element verfolgt. Die Messung erfolgte mit einer Proteinkonzentration von 1 µM bzw. 4 µM, in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Heizrate betrug 60 K pro Stunde, wobei alle 0,2 K ein Messwert aufgenommen wurde, die Dämpfung betrug 8 s, die Bandbreite 1,0 nm.

Für die thermische Denaturierung sehr stabiler Proteine konnten keine vollständigen Entfaltungsübergänge aufgenommen werden. Da die Grundlinie des denaturierten Proteins schlecht definiert war, war eine quantitative Auswertung nach einem Zweizustandsmodell nicht möglich. Um den Übergangsmittelpunkt ablesen zu können, wurde mit dem Programm Origin 5.0 die Ableitung der Datenpunkte nach der Temperatur bestimmt, was der Steigung der Kurve in jedem Punkt entspricht. Hierzu wurde jeweils nur jeder 5. gemessene Datenpunkt verwendet und die Steigung jeweils über 7 Punkte gemittelt. Das Maximum der resultierenden Kurve entspricht dem Wendepunkt der Denaturierungskurve und damit dem Übergangsmittelpunkt. Der Fehler dieser Auswertung ist relativ groß und wird unter anderem durch die Breite des resultierenden Peaks bestimmt.

2.2.7 Interaktion von Mia40 und Cox17*

2.2.7.1 Komplexbildung zwischen Mia40 und Cox17*

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 1 mM EDTA

2.2.7.1.1 Gleichgewichtstitrationen

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D des Komplexes aus Mia40 und Cox17* wurden Fluoreszenztitrationen an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrophotometer durchgeführt. 0,25 μ M Mia40_{C296SW294F}-AEDANS bzw. Cox17*_{1Cys}-AEDANS wurde mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Bindungspartners titriert. Die Messungen wurden bei 15 °C und einer Dämpfung von 0,5 s in temperierbaren Fluoreszenzrührküvetten der Schichtdicke 1 cm durchgeführt. Als Sonde diente die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz bei 470 nm (Bandbreite 5 nm) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite 3 nm). Zusätzlich wurde der Verlauf der Akzeptorfluoreszenz bei 470 nm nach direkter Anregung bei 336 nm verfolgt. Bei der Bindung gilt folgendes Gleichgewichtsschema:



Die Dissoziationskonstante K_D berechnet sich nach Gleichung 3:

$$K_D = \frac{[\text{Mia40}] \cdot [\text{Cox17*}]}{[\text{Mia40} \cdot \text{Cox17*}]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad \text{Gleichung 3}$$

K_D : Dissoziationskonstante (in M), k_{on} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (in $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), k_{off} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (in s^{-1}), $[\text{Mia40}]$: Konzentration an freiem Mia40 (in M), $[\text{Cox17*}]$: Konzentration an freiem Cox17* (in M), $[\text{Mia40} \cdot \text{Cox17*}]$: Konzentration an Komplex aus Mia40 und Cox17* (in M)

Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung, d.h. $[\text{Mia40}] = [\text{Mia40}]_0 - [\text{Mia40} \cdot \text{Cox17*}]$ und $[\text{Cox17*}] = [\text{Cox17*}]_0 - [\text{Mia40} \cdot \text{Cox17*}]$ (wobei $[\text{Mia40}]_0$ und $[\text{Cox17*}]_0$ die Gesamtkonzentration an Mia40 bzw. Cox17* bezeichnen) ergibt sich aus Gleichung 3 die Konzentration des Mia40-Cox17*-Komplexes.

$$[\text{Mia40} \cdot \text{Cox17*}] = \frac{[\text{Mia40}]_0 + [\text{Cox17*}]_0 + K_D - \sqrt{([\text{Mia40}]_0 + [\text{Cox17*}]_0 + K_D)^2 - 4[\text{Mia40}]_0[\text{Cox17*}]_0}}{2} \quad \text{Gleichung 4}$$

Für den Verlauf der AEDANS-Fluoreszenz gilt:

$$F = F_0 + \Delta F \cdot \frac{[\text{Mia40} \cdot \text{Cox17}^*]}{[\text{Cox17}^*]_0} \quad \text{Gleichung 5}$$

F: gemessene Fluoreszenz, F_0 : Fluoreszenz des freien Protein-AEDANS, ΔF : maximale Fluoreszenzänderung bei vollständiger Bindung

Durch Kombination von Gleichung 4 und Gleichung 5 ergibt sich Gleichung 6, die an die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration angepasst werden kann, um Werte für die Dissoziationskonstante K_D zu erhalten.

$$F - F_0 = (F - F_\infty) \frac{[\text{Mia40}]_0 + [\text{Cox17}^*]_0 + K_D - \sqrt{([\text{Mia40}]_0 + [\text{Cox17}^*]_0 + K_D)^2 - 4 \cdot [\text{Mia40}]_0 \cdot [\text{Cox17}^*]_0}}{2 \cdot [\text{Mia40}]_0}$$

Gleichung 6

2.2.7.1.2 Kinetik der Assoziation von Mia40 und Cox17*

Die Kinetik der Komplexbildung wurde mit einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer, ebenfalls mittels FRET, verfolgt. Dafür wurden je 0,5 μM Mia40_{C296SW294F}-AEDANS bzw. Cox17*_{1Cys}-AEDANS mit den jeweiligen Bindungspartnern im Verhältnis 1:1 gemischt und die Änderung der integralen Fluoreszenz des Akzeptors nach Anregung des Donors bei 280 nm verfolgt. Die Bandbreite des Anregungsspalts betrug jeweils 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Streulicht und Fluoreszenzlicht unterhalb von 450 nm wurden durch eine 5 mm-Küvette, gefüllt mit 10 mM *p*-Nitroanilin (in 100 % Ethanol), vor dem Photomultiplier absorbiert. Es wurden zehn einzelne Kinetiken gemessen, gemittelt und durch Angleich einer monoexponentiellen Funktion ausgewertet (Gleichung 7), wodurch die Amplituden und Raten der Reaktion bestimmt wurden. Der Amplitudenverlauf in Abhängigkeit der Titrandenkonzentration kann entsprechend einer Gleichgewichtstitration analysiert werden um die Dissoziationskonstante K_D der beiden Reaktionspartner zu bestimmen (Gleichung 6). Die Raten sind linear abhängig von der Ligandenkonzentration, wobei die Geradensteigung der mikroskopischen Rate der Assoziation k_{on} und der Schnittpunkt mit der Ordinate der Rate der Dissoziation k_{off} entspricht.

$$F(t) = F_0 + \sum_{i=0}^n A_i \cdot e^{-k_i \cdot t} \quad \text{Gleichung 7}$$

$F(t)$: Fluoreszenzsignal zur Zeit t , F_0 : Fluoreszenzsignal zur Zeit $t = 0$ s, A_i : Amplitude der Signaländerung, k_i : Rate der Signaländerung (in s^{-1})

2.2.7.2 Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17*

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4

Um das Ausmaß der Bildung des gemischten Disulfids zu untersuchen, wurden je 20 μ M Mia40 und Cox17*_{1Cys}-Varianten in Messpuffer bei 15 °C inkubiert. Nach jeweils 5 s und 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 mM Iodacetat gestoppt und die Proben durch nicht reduzierende SDS-PAGE analysiert.

Die Kinetik der Ausbildung des gemischten Disulfids wurde mit einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Es wurden je 0,25 μ M Mia40 und die Cox17*_{1Cys}-Varianten im Verhältnis 1:1 gemischt und die Änderung der integralen Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Bandbreite des Anregungsspalts betrug jeweils 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm. Streulicht und Fluoreszenzlicht unterhalb von 320 nm wurden durch eine 5 mm-Küvette, gefüllt mit 10 mM cGMP, pH 1,4 vor dem Photomultiplier absorbiert. Es wurden zehn einzelne Kinetiken gemessen, gemittelt und durch Angleich einer monoexponentiellen Funktion mit linearem Term ausgewertet, wodurch die Amplituden und Raten der Reaktion bestimmt wurden.

2.2.8 Bestimmung der pK-Werte von Cysteinen

2.2.8.1 Bestimmung der pK-Werte anhand der Reaktion mit Mia40

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 5,8, 6,2, 6,5, 7,0, 7,4, 7,7
100 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 7,7, 8,2, 8,6, 9,0

Um die pK-Werte der Cysteine in Cox17* zu bestimmen, wurde die Kinetik der Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen 0,25 μ M Mia40 und 15 μ M der Cox17*_{1Cys}-Varianten wie unter 2.2.7.2 beschrieben in den Messpuffern verfolgt. Die apparenten Raten der Reaktion wurden gegen den pH-Wert aufgetragen und die pK-Werte durch Analyse nach Gleichung 8 bestimmt.

$$k_{\text{app}} = k_{\text{SH}} + \frac{k_{\text{S}^-} - k_{\text{SH}}}{1 + 10^{(\text{pK} - \text{pH})}}$$

Gleichung 8

k_{app} : apparente Rate der Fluoreszenzänderung, k_{S^-} , k_{SH} : Raten der Reaktion der vollständig deprotonierten bzw. protonierten Cysteine

2.2.8.2 Bestimmung von pK-Werten durch Reaktion mit DTNB

Messpuffer: 100 mM Kaliumacetat, pH 5,0, 5,8
 100 mM Kaliumphosphat, pH 5,8, 6,2, 6,5, 7,0, 7,4, 7,7
 100 mM Tris/HCl, pH^{15 °C} 7,7, 8,2, 8,6, 9,0
 100 mM Glycin, pH^{15 °C} 9,0, 9,5, 10,5

Es wurde die Reaktion von 50 µM DTNB mit je 5 µM Cox17*_{1Cys}, Mia40_{C296S}, Mia40_{C298S}, reduziertem Mia40, bzw. einer Mischung aus je 5 µM Cox17*_{1Cys} und Mia40 oder Mia40_{C296S}C_{298S} mit einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer verfolgt. Es wurde die Änderung der Absorption bei 412 nm in jeweils fünf einzelnen Kinetiken verfolgt, gemittelt und durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet (Gleichung 7). Die apparenten Raten wurden gegen den pH-Wert aufgetragen und die pK-Werte durch Analyse mit Gleichung 8 bestimmt.

2.2.9 Bestimmung von Reduktionspotentialen

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

Es wurde je 10 µM Protein mit 0,1 mM GSSG und 0,08 - 33 mM GSH bei 15 °C für mindestens 6 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 mM Iodacetat gestoppt und die Proben durch native PAGE (2.2.1.3) bzw. nicht reduzierende SDS-PAGE (2.2.1.2) analysiert. Die Bandenintensität des gemischten Disulfids wurde mit dem Programm ImageJ ausgewertet, durch das Verhältnis zur Bande des gemischten Disulfids in Abwesenheit von Reduktionsmittel normiert und gegen das Verhältnis der GSH- und GSSG-Konzentration aufgetragen. Die Daten wurden durch Gleichung 9 und Gleichung 10 ausgewertet. Es wurde zusätzlich ein pH-abhängiger Term berücksichtigt (Dryhurst, 1977), da das biochemische Standardreduktionspotential für pH 7,0 definiert ist, die Messungen jedoch bei pH 7,4 durchgeführt wurden. Für das biochemische Standardreduktionspotential des Redoxpaares GSSG/GSH wurde ein Wert von -0,24 V verwendet (Aslund *et al.*, 1997).

$$y = \frac{[\text{GSH}]^2 / [\text{GSSG}]}{[\text{GSH}]^2 / [\text{GSSG}] + K_{\text{eq}}}$$

Gleichung 9

$$E^{0'} = E_{\text{GSH/GSSG}}^{0'} - \frac{RT}{nF} \ln K_{\text{eq}} - \frac{2,3RT}{nF} (\text{pH} - 7,0) \quad \text{Gleichung 10}$$

y: Anteil reduziertes Protein, [GSH]: Konzentration an reduziertem Glutathion (in M), [GSSG]: Konzentration an oxidiertem Glutathion (in M), K_{eq} : Gleichgewichtskonstante der Reduktion des gemischten Disulfids, $E^{0'}$: Biochemisches Standardreduktionspotential (V), R : Allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T : Temperatur (in K), n : Anzahl der übertragenen Elektronen, F : Faraday-Konstante (96485 C mol^{-1})

Gleichung 11 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Gleichgewichtskonstanten K einer Reaktion und der freien Reaktionsenthalpie ΔG . Wird für die Gleichgewichtskonstante K_{eq} aus der Nernst-Gleichung (Gleichung 10) eingesetzt, so ergibt sich die freie Enthalpie der Reduktion eines Disulfids ΔG_{Red} (Gleichung 12).

$$\Delta G = -RT \ln K \quad \text{Gleichung 11}$$

$$\Delta G_{\text{Red}} = nF \cdot E^{0'} \quad \text{Gleichung 12}$$

ΔG : Freie Enthalpie (J mol^{-1}), ΔG_{Red} : Freie Enthalpie der Reduktion eines Disulfids (J mol^{-1}), K : Gleichgewichtskonstante einer Reaktion, K_{eq} : Gleichgewichtskonstante der Reduktion eines Disulfids, $E^{0'}$: Biochemisches Standardreduktionspotential (V), R : Allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T : Temperatur (in K), n : Anzahl der übertragenen Elektronen, F : Faraday-Konstante (96485 C mol^{-1})

2.2.10 Oxidative Rückfaltung von RNase A als Test auf Disulfidisomeraseaktivität

Rückfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$ 8,0, 0,3 mM GSSG, 3 mM GSH

Messpuffer: 0,1 M Bis-Tris, $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$ 7,0

Es wurde die Rückfaltung von 5 μM reduzierter RNase A in Rückfaltungspuffer in An- und Abwesenheit von Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen bei 25°C initiiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde je 10 μl Probe entnommen und zu 990 μl 0,9 mM 2'3'-cCMP in Messpuffer bei 25°C gegeben. Die Hydrolyse von 2'3'-cCMP durch nativ gefaltete RNase A wurde Anhand der Differenz der Absorptionen bei 296 nm und 310 nm an einem Hewlett-Packard UV/VIS-Dioden-Array Spectrometer 8452A in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke aufgezeichnet. Die relative Aktivität wurde durch Bestimmung der Anfangssteigung der Kurve und Vergleich mit der Steigung eines Messansatzes unter identischen Bedingungen mit 100 % nativer RNase A berechnet.

3 Ergebnisse und Diskussion

Das mitochondriale Enzym Mia40 ist eine neuartige Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase, die sich in ihrer Struktur deutlich von den bisher bekannten Thioredoxin-ähnlichen Enzymen wie DsbA oder PDI unterscheidet. Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen sind unter anderem dafür verantwortlich Disulfide in Proteine einzuführen.

Die katalysierte, oxidative Faltung von Proteinen läuft nach einem allgemeinen Schema ab (Abbildung 6). Zunächst erfolgt die nicht kovalente Komplexbildung zwischen Substrat und Enzym, die über die Interaktion hydrophober Oberflächen vermittelt wird (Schritt 1). Nachfolgend bildet sich ein gemischtes Disulfid zwischen einem Cystein des katalytischen Disulfids des Enzyms und einem Cystein des Substrats (Schritt 2). Ausgehend von diesem kovalenten Intermediat kann die Weiterreaktion in eine unproduktive oder eine produktive Richtung erfolgen. Die unproduktive Rückreaktion erfolgt durch Angriff des zweiten Cysteins des katalytischen Disulfids der Oxidoreduktase. Im produktiven Fall greift ein weiteres Cystein des Substrats an und dieses wird in oxidierten Form freigesetzt (Schritt 3). Enthält das Substrat mehr als zwei Cysteine kann sich ein natives oder ein nicht natives Disulfid ausbilden, das gegebenenfalls durch Isomerisierung aufgelöst werden muss.

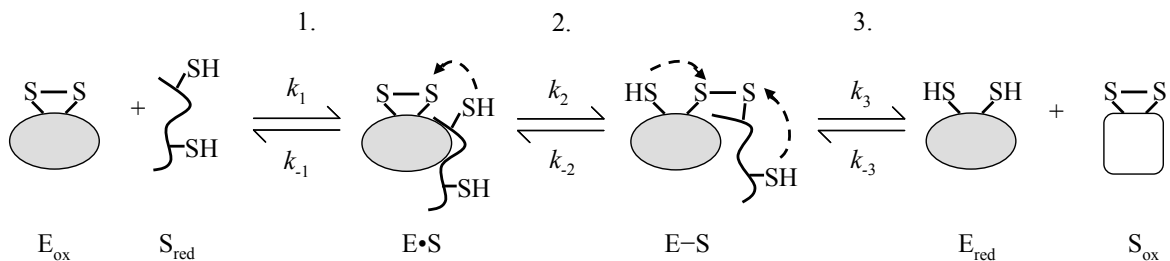


Abbildung 6: Schema der Substratoxidation durch eine Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase. 1. Es bildet sich ein nicht kovalenter Komplex zwischen Enzym und Substrat. 2. Durch Angriff eines Cysteins des Substrats am katalytischen Disulfid bildet sich das gemischte Disulfid zwischen Enzym und Substrat. 3. Es erfolgt die intramolekulare Auflösung des gemischten Disulfids durch erneuten Angriff eines Substratcysteins, was zur Freisetzung des oxidierten Substrats führt. E_{ox} : oxidiertes Enzym, S_{red} : reduziertes Substrat, $E \cdots S$: nicht kovalenter Komplex, $E-S$: gemischtes Disulfid, E_{red} : reduziertes Enzym, S_{ox} : oxidiertes Substrat.

Um die molekulare Basis der Katalyse durch Mia40 aufzuklären, wurden die Interaktion mit einem natürlichen Substrat und der Mechanismus der oxidativen Faltung analysiert. Hierfür wurde Mia40 aus *S. cerevisiae* verwendet. Mia40 aus Hefe besitzt einen N-terminalen Transmembranbereich, der das Enzym in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Zur besseren Handhabung wurde dieser Membrananker entfernt und für die Experimente ein Mia40-Fragment, bestehend aus den Aminosäuren 284-403, verwendet, das im folgenden vereinfacht als Mia40 bezeichnet wird. Es konnte gezeigt werden, dass Mia40 aus Hefe auch ohne Membrananker funktional ist und durch humanes Mia40, das dem C-terminalen Bereich

des Hefeproteins entspricht (AS 290-348 der Aminosäuresequenz aus Hefe), *in vivo* komplementiert werden kann (Chacinska *et al.*, 2008).

3.1 Konstruktion von Eindisulfidvarianten von Cox17*

Für die Untersuchung des Mechanismus der oxidativen Faltung durch Mia40 wurde das natürliche Substrat Cox17 verwendet. Cox17 ist ein Kupferchaperon aus dem mitochondrialen Intermembranraum (IMS), das an der Biogenese von Cytochrom c beteiligt ist (Glerum *et al.*, 1996). Es wird im Cytosol synthetisiert und als reduziertes Vorläuferprotein über den TOM-Komplex in den IMS importiert (Mesecke *et al.*, 2005). Cox17 enthält neben zwei strukturellen Disulfiden noch drei Cysteine im N-terminalen Bereich (Cys16, 23, 24), die für die Bindung von Kupferionen wichtig sind (Abbildung 7). Um unerwünschte Nebenreaktionen während der oxidativen Faltung zu verhindern, wurden diese Cysteine in allen verwendeten Cox17-Varianten gegen Ser ausgetauscht. Im Weiteren wird diese Variante als Cox17* bezeichnet. Die NMR-Strukturen von holo- und apo-Cox17 aus Mensch und Hefe zeigen, dass sich die Struktur durch Entfernen der Cu^+ Ionen nur lokal in der Bindungsregion ändert. Der kompakt gefaltete Bereich mit den beiden Disulfiden bleibt unverändert (Abajian *et al.*, 2004; Banci *et al.*, 2008b). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cox17 mit den C23S und C24S Mutationen wie das Wildtyp-Protein durch Interaktion mit Mia40 in den IMS transportiert wird (Heaton *et al.*, 2000) und dass Metallbindung nicht für den Import notwendig ist (Mesecke *et al.*, 2005). Daher kann angenommen werden, dass sich Cox17 und Cox17* nicht in den Faltungseigenschaften unterscheiden.

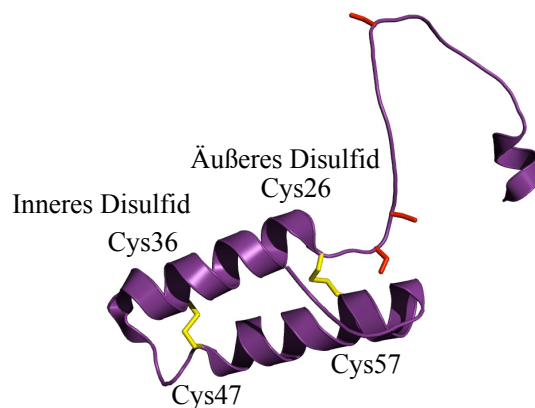


Abbildung 7: Struktur von Cox17 aus *S. cerevisiae*. Die Cu^+ -bindenden Cysteine, die in den verwendeten Cox17*-Varianten gegen Serine ausgetauscht wurden sind als rote, die strukturellen Disulfide als gelbe Stäbchen dargestellt. Die strukturellen Cysteine sind gemäß der Aminosäuresequenz nummeriert, wobei Cys26 und 57 das äußere und Cys36 und 47 das innere Disulfid bilden. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol und dem pdb-Eintrag 1U97 erstellt.

Neben Cox17* mit beiden strukturellen Disulfiden wurden auch Varianten verwendet, die mit Cys26 und Cys57 nur die äußere (Cox17*_{SSaußen}) bzw. mit Cys36 und Cys47 nur die innere Disulfidbrücke ausbilden können (Cox17*_{SSinnen}). Diese Proteine sind etwa für die Frage nach

der Reihenfolge der Oxidation der Disulfide durch Mia40 von Bedeutung. Im Gegensatz zu Arbeiten anderer Gruppen wurden in den Varianten die Cysteine nicht ausschließlich gegen Ser ausgetauscht. Für das Vergraben von nicht wasserstoffverbrückten Serinseitenketten muss eine hohe Desolvatisierungsenergie aufgebracht werden, weshalb sie sich stark destabilisierend auf die Struktur auswirken. Für die Auswahl passender Aminosäuren wurde die Zugänglichkeit der Reste durch das Lösungsmittel, sowie die umgebenden Reste, berücksichtigt. Cys57 ist exponiert und wurde daher gegen Ser ausgetauscht. Alle anderen Cysteine befinden sich in einer hydrophoben Umgebung und wurden daher mit den Mutationen C26A, C36I und C47A durch unpolare Reste passender Größe ersetzt. In einer Variante ohne Cysteine (Cox17*_{0SS}) wurden diese vier Substitutionen kombiniert.

Cox17 besteht aus einem unstrukturierten N-Terminus (Reste 1-25), der die Cu⁺-Bindungsstelle enthält und einem gefalteten Helix-Schleife-Helix-Motiv, in dem die antiparallelen Helices durch die Disulfidbrücken verbunden werden. Dies reflektiert sich im CD-Spektrum, das hauptsächlich durch das helikale Signal geprägt ist (Abbildung 8 a). Cox17 ist ein stark polares Molekül. 29 der 69 Aminosäuren sind geladen, während nur jeweils fünf Reste aliphatischen und aromatischen Charakter haben. Daher kann sich kein hydrophober Kern zur Stabilisierung der nativen Struktur ausbilden. Dementsprechend ist die Helixpropensität in Abwesenheit der Disulfide laut dem Programm Agadir (Munoz & Serrano, 1994) nur sehr gering. In Übereinstimmung hiermit zeigen die CD-Spektren für reduziertes Cox17*, sowie für Cox17*_{0SS} Minima bei ca. 200 nm, sowie ein negatives Signal bei 195 nm, was auf ein weitgehend ungefaltetes Protein hinweist.

Die innere und die äußere Disulfidbrücke unterscheiden sich deutlich in ihrem Beitrag zur Stabilität. Das CD-Spektrum von Cox17*_{SSinnen} deutet auf nur wenig geordnete Struktur hin, während Cox17*_{SSaußen} stark helikal ist. Die Ausbildung der äußeren Disulfidbrücke scheint also auszureichen um einen nativ ähnlichen, gefalteten Zustand einzunehmen. Allerdings ist diese Variante gegenüber dem Wildtyp-Protein stark destabilisiert, wie die thermisch induzierten Entfaltungsübergänge zeigen (Abbildung 8 b). Während Cox17* mit zwei Disulfiden bis ca. 80 °C nativ gefaltet bleibt, weist Cox17*_{SSaußen} einen Entfaltungsmittelpunkt von ca. 50 °C auf. Cox17*_{SSinnen} ist bereits bei 10 °C weitgehend entfaltet und Cox17*_{0SS} ist über den gesamten Temperaturbereich denaturiert.

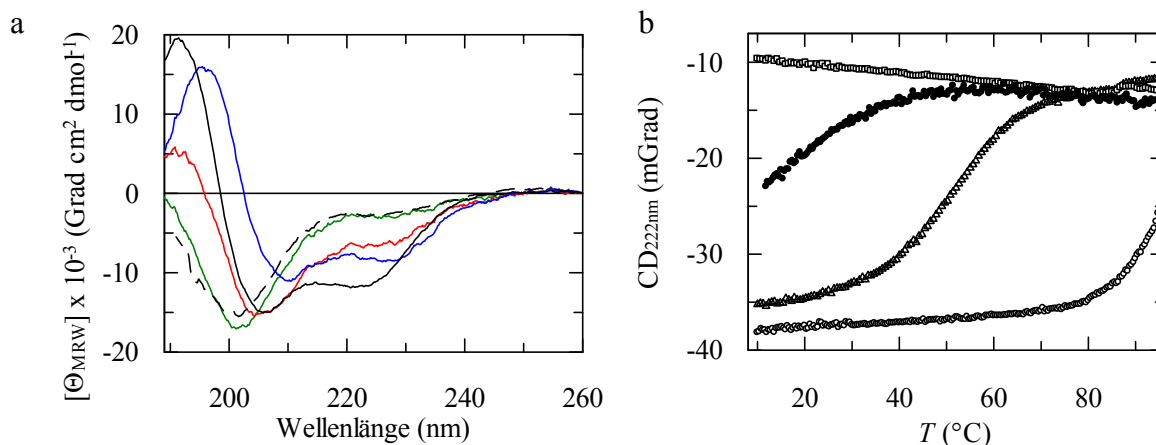


Abbildung 8: Sekundärstruktur und Stabilität verschiedener Cox17*-Varianten. (a) Gezeigt sind die CD-Spektren von 4 μM oxidiertem (—) und reduziertem Cox17* (---), sowie von Cox17*^{SSaußen} (—), Cox17*^{SSinnen} (—) und Cox17*^{OSS} (—) bei 15 °C, gemessen in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4. Es wurden jeweils zehn Einzelspektren aufgezeichnet und gemittelt. (b) Thermisch induzierte Entfaltungsübergänge von je 4 μM Cox17* (○), Cox17*^{SSaußen} (Δ), Cox17*^{SSinnen} (●) und Cox17*^{OSS} (□) verfolgt anhand der Änderung des CD-Signals bei 222 nm. Die Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 mit einer Heizrate von 60 °C/h durchgeführt.

3.2 Mia40 bildet nicht kovalente Komplexe mit entfalteten Proteinen

Wie in Abbildung 6 beschrieben, läuft die Oxidation eines Substratproteins durch Mia40 vereinfacht in drei Schritten ab. Die Teilreaktionen sollten nun nacheinander untersucht werden. Zunächst wurde die Ausbildung des nicht kovalenten Komplexes zwischen Cox17* und Mia40 mit Hilfe von Förster Resonanz Energietransfer (FRET) analysiert. Um die Weiterreaktion hin zur kovalenten Bindung des Substrats zu verhindern, wurde eine katalytisch inaktive Variante von Mia40 verwendet. Cys296 des katalytischen Disulfids wurde gegen Ser ausgetauscht und das verbleibende Cys298 kovalent mit dem Akzeptorfluorophor AEDANS verknüpft. Um intramolekularen FRET zu verhindern wurde Trp294 gegen Phe ausgetauscht. In Cox17* wurde an der Position 50 ein Trp als Fluoreszenzdonor eingebracht.

Befinden sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe, z.B. bei einem Bindungsereignis, führt der Energietransfer zu einer Abnahme der Donorfluoreszenz mit gleichzeitiger Zunahme der Akzeptorfluoreszenz. Die Fluoreszenzspektren von Cox17*F50W_{OSS}, Mia40-AEDANS und einer Mischung beider Proteine zeigten keine Abnahme der Trp-Fluoreszenz bei 350 nm, da die Bindung von Cox17* an Mia40 in den unmarkierten Proteinen *per se* zu einer Zunahme der Trp-Fluoreszenz führt, wobei sich beide Effekte kompensieren (Abbildung S 1). Der Energietransfer von Trp auf AEDANS führt jedoch zu einer Erhöhung der AEDANS-Fluoreszenz bei 470 nm, was als Sonde für die Bindungsexperimente verwendet wurde.

Die Assoziation von Mia40 und Cox17* im Gleichgewicht wurde verfolgt, indem eine Mia40-AEDANS-Lösung mit steigenden Konzentrationen an Cox17*F50W titriert wurde. Die Mia40-AEDANS-Konzentration wurde konstant gehalten. Für natives, oxidiertes

Cox17*F50W konnte kein Fluoreszenzanstieg detektiert werden, die reduzierte Form bindet hingegen mit einem K_D von $4,8 \mu\text{M}$ an Mia40 (Abbildung 9 a,b, Tabelle 1). Der gleiche Effekt wurde für Cox17*_{SSaußen} beobachtet, wo ebenfalls die reduzierte, nicht aber die oxidierte Form an Mia40 bindet. Cox17* und Cox17*_{SSaußen} weisen in der oxidierten Form einen geordneten Faltungszustand auf, während die Reduktion der Disulfide zur Entfaltung des Proteins führt. Die Unterschiede in der Bindung der oxidierten und reduzierten Proteine weisen daraufhin, dass die Affinität von Mia40 zu den Substraten in erster Linie vom Ausmaß exponierter hydrophober Oberflächen abhängt. Cox17*_{SSinnen} ist auch in der oxidierten Form weitgehend unstrukturiert (Abbildung 8 a). Daher wird es von Mia40 als Substrat erkannt und gebunden, allerdings führt der Anteil gefalteter Struktur zu einer Verschlechterung der Bindung (Abbildung 9 a,b).

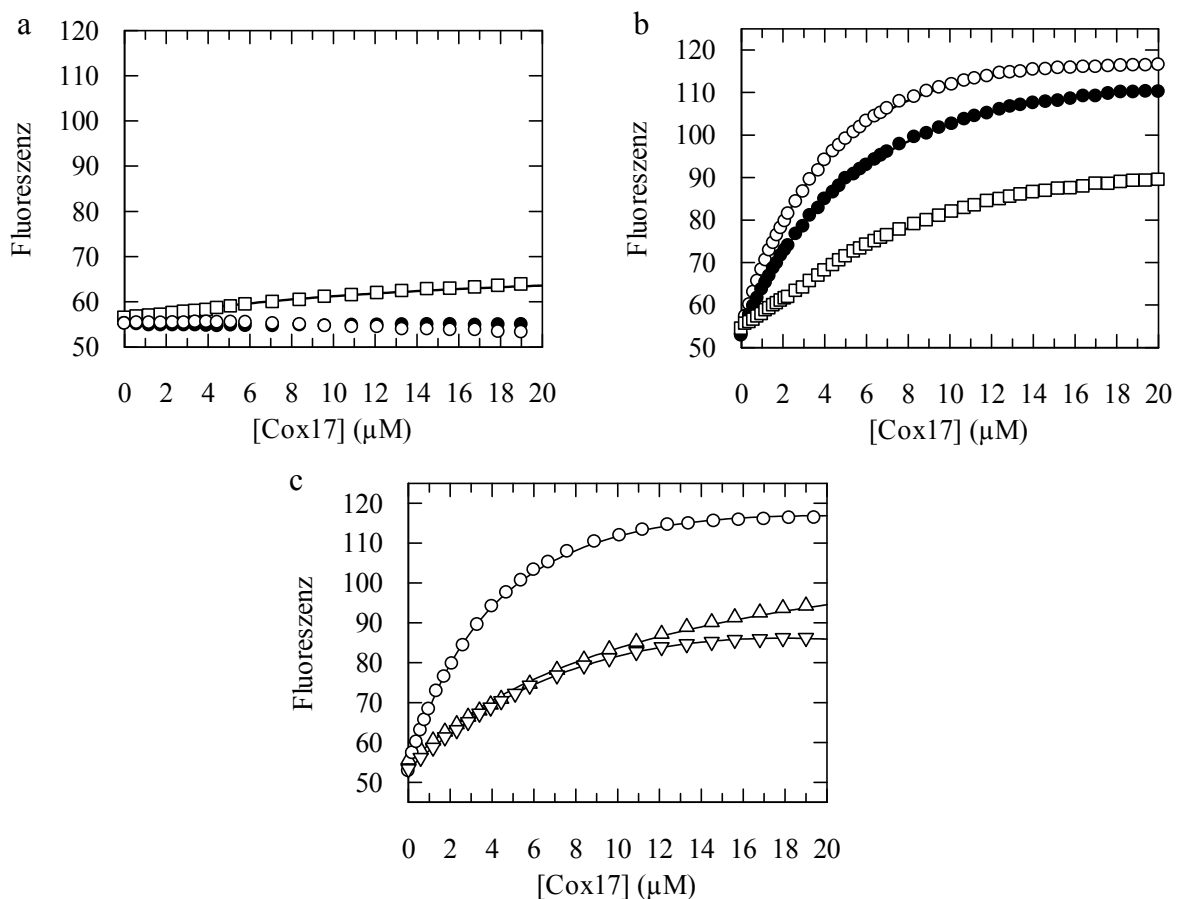


Abbildung 9: Assoziation von Cox17* und Mia40. Gezeigt ist die Assoziation von $0,5 \mu\text{M}$ Mia40-AEDANS und (a) oxidiertem bzw. (b) reduziertem Cox17*F50W (○), Cox17*F50W_{SSaußen} (●) und Cox17*F50W_{SSinnen} (□), sowie (c) reduziertem Cox17*F50W (○), Cox17*F50W_{0SS} (Δ) und RCM- α -Lactalbumin (▽) gemessen durch die Fluoreszenzänderung bei 490 nm nach Anregung bei 280 nm . Die Messungen wurden in $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, $\text{pH } 7,4$ bei 15°C durchgeführt. Die Spaltbreiten von Anregung und Emission betrugen 3 nm und 5 nm . Die durchgezogenen Linien zeigen einen Angleich an die Datenpunkte gemäß Gleichung 6, wobei für RCM- α -Lactalbumin zusätzlich ein linearer Beitrag berücksichtigt wurde. Die resultierenden Werte sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Um zu prüfen, ob die Cysteine des Substrats für die nicht kovalente Interaktion mit Mia40 benötigt werden, wurde eine Variante verwendet, in der alle Cysteine ersetzt wurden. In ihrer

Affinität zu Mia40 ähnelt diese Variante den reduzierten Proteinen, die Cysteine sind demnach für die nicht kovalente Komplexbildung nicht wichtig (Abbildung 9 c). Weiterhin sollte untersucht werden, ob Mia40 spezifisch mit den natürlichen Substratproteinen interagiert, oder eher eine allgemeine Affinität zu Proteinen besitzt, die hydrophobe Oberflächen exponieren. Hierfür wurde α -Lactalbumin, ein Protein aus Kuhmilch mit vier Disulfiden, verwendet. Nach Reduktion und Carboxymethylierung der Cysteine (RCM- α -Lactalbumin) liegt das Protein permanent entfaltet vor. Es zeigte sich, dass Mia40 auch an das nicht verwandte RCM- α -Lactalbumin bindet, wenn auch mit einem erhöhten K_D von 23 μM (Abbildung 9 c) und damit bei der Komplexbildung keine ausgeprägte Substratspezifität aufweist.

Um Informationen über die Dynamik der Komplexbildung zu erhalten, wurden zusätzlich zu den Gleichgewichtsexperimenten Bindungskinetiken aufgezeichnet, wobei wiederum der Energietransfer von Trp auf AEDANS als Sonde diente. Es zeigte sich, dass die Bindungsreaktion extrem schnell ist. Für 10 μM reduziertes Cox17* läuft die Reaktion innerhalb von 35 ms vollständig ab, was einer apparenten Rate von 140 s^{-1} entspricht (Abbildung 10 a). Wie für eine einfache Bindungsreaktion zu erwarten ist, zeigen die Amplituden ein Sättigungsverhalten, während die Ratenkonstanten linear von der Substratkonzentration abhängen (Abbildung 10 b und c). Die lineare Regression ergab eine Assoziationsrate (k_{on}) von 9,5 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aus der Steigung und eine Dissoziationsrate (k_{off}) von 43 s^{-1} aus dem Schnittpunkt mit der Ordinate. Dies entspricht einer mittleren Lebensdauer des Komplexes von nur 23 ms, was zeigt, dass die nicht kovalente Interaktion von Enzym und Substrat hochdynamisch ist.

In Übereinstimmung mit den Gleichgewichtsdaten konnten die Bindungsparameter für alle reduzierten Cox17*-Varianten und RCM- α -Lactalbumin ermittelt werden (Tabelle 1). Es zeigte sich, dass die Assoziationsraten für alle Proteine mit 9 bis 13 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sehr ähnlich sind, während die Dissoziationsraten zwischen 40 und 230 s^{-1} schwanken und damit die Affinität bestimmen. Wurden die oxidierten Proteine verwendet, konnte wiederum nur für Cox17*_{SSinnen} Bindung detektiert werden (Abbildung 10 d). Der aus den Ratenkonstanten ermittelte K_D ist gegenüber dem reduzierten Protein von 11 μM auf 54 μM erhöht, was sowohl auf einen geringeren k_{on} -Wert, als auch auf einen höheren k_{off} -Wert zurückzuführen ist.

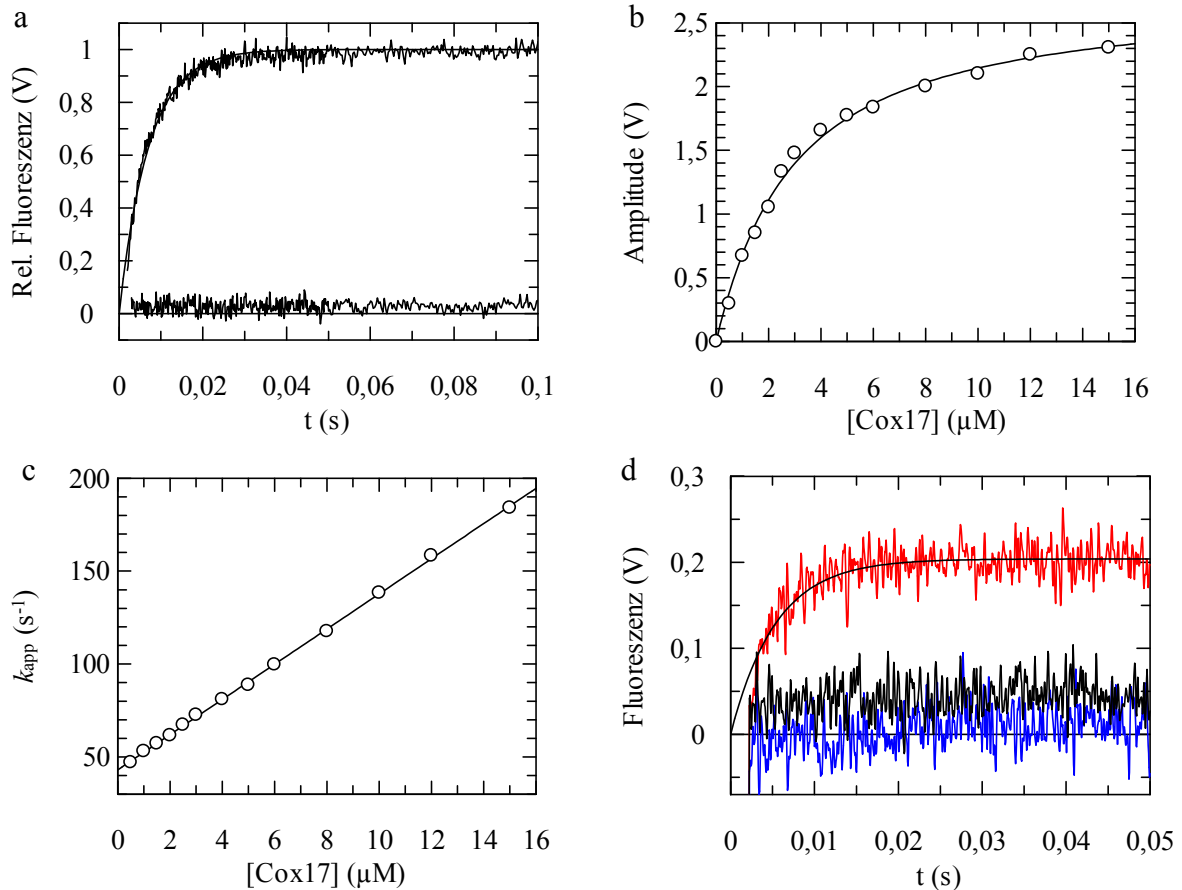


Abbildung 10: Kinetik der Ausbildung des nicht kovalenten Komplexes zwischen Mia40 und Cox17*. (a) Verfolgt wurde die Reaktion von je 0,5 µM Mia40-AEDANS und 0 bzw. 10 µM reduziertem Cox17*F50W anhand der Fluoreszenzänderung über 460 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Amplituden (b) und Raten (c) gegen die Cox17*-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich an die Amplituden gemäß Gleichung 6, bzw. einer linearen Regression der Raten. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst. (d) Gezeigt ist die Reaktion von 0,5 µM Mia40-AEDANS und je 15 µM oxidiertem Cox17*F50W (—), Cox17*F50W_{SSaußen} (—) und Cox17*F50W_{SSinnen} (—). Die durchgezogene Linie entspricht einem Angleich durch eine monoexponentielle Funktion. Alle Messungen wurden bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA durchgeführt.

In Mia40-AEDANS ist der Akzeptor der Substratbindungsstelle direkt benachbart. Um sicherzustellen, dass diese Modifikation die Bindungseigenschaften nicht beeinflusst, wurde in einem reziproken Ansatz der Akzeptor mit Cox17-Varianten verknüpft, die nur je eines der vier Cysteine aufweisen (Cox17*_{CysX}-AEDANS). Als Donor diente Trp294 in Wildtyp-Mia40, das im Bereich der Substratbindungsstelle liegt.

Es zeigte sich, dass die Lage des Akzeptormoleküls die Bindungsparameter leicht beeinflusst (Abbildung S 2, Tabelle 1). Die Dissoziationskonstanten aus der Auftragung der Ratenkonstanten variieren je nach markierter Cox17*-Variante zwischen 0,8 und 6,7 µM, und liegen damit im Bereich der Werte, die für Cox17*50W und Mia40-AEDANS erhalten wurden. Ebenfalls erhalten bleibt die hohe Dynamik der Komplexbildung. Besonders auffällig war, dass die Amplitude für die Bindung von Cox17*_{26C}-AEDANS an Mia40 sehr klein ist.

Dies deutet darauf hin, dass hier der AEDANS-Rest besonders weit von Trp294 in Mia40 und damit vom katalytischen Zentrum entfernt ist, auch wenn für die Transfereffizienz neben der Entfernung weitere Faktoren, wie z.B. Unterschiede in der freien Drehbarkeit des Akzeptors eine Rolle spielen können.

Tabelle 1: Parameter der Assoziation von Cox17* und Mia40

AEDANS-Mia40 +	Gleichgewicht		Kinetik		
	K_D^{eq} (μM)	K_D^{kin} (μM)	k_{on} (s ⁻¹ μM ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	$k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (μM)
Cox17*50W red	4,8 ± 0,1	2,6 ± 0,2	9,46 ± 0,06	43,1 ± 0,4	4,6
Cox17*50W _{SSaußen} red	6,9 ± 0,1	3,9 ± 0,4	9,0 ± 0,2	75 ± 1	8,3
Cox17*50W _{SSinnen} red	8,6 ± 0,5	15 ± 2	8,9 ± 0,4	96 ± 3	10,8
Cox17*50W _{SSinnen} ox	15 ± 1	58 ± 22 ¹⁾	3,3 ± 0,1	179 ± 2	54,3
Cox17*50W _{0SS}	11,7 ± 0,5	11 ± 3	9,4 ± 0,3	187 ± 4	16,8
RCM-α-Lactalbumin	23 ± 2	11 ± 3	13,0 ± 0,6	230 ± 5	17,4
Mia40 +					
Cox26C-AEDANS	2,30 ± 0,08	3,1 ± 0,3	3,9 ± 0,2	26,0 ± 0,6	6,7
Cox36C-AEDANS	2,6 ± 0,1	3,4 ± 0,3	7,4 ± 0,2	18,5 ± 0,9	2,5
Cox47C-AEDANS	1,09 ± 0,03	1,36 ± 0,07	15,6 ± 0,3	25,0 ± 1,7	2
Cox57C-AEDANS	0,55 ± 0,04	0,67 ± 0,06	11,7 ± 0,5	9,9 ± 0,1	0,8

Die Bindungsparameter wurden über FRET von Trp auf den Akzeptor AEDANS im Gleichgewicht, oder in kinetischen Messungen, wie Abbildung 9 und Abbildung 10 in beschrieben, bestimmt. Die angegebenen Fehler entsprechen der Standardabweichung des Datenangleichs. Alle Werte wurden in unabhängigen Messungen reproduziert. ¹⁾ Amplituden von Bindungsreaktionen mit geringer Affinität weisen einen sehr großen Fehler auf, da im zugänglichen Substratkonzentrationsbereich keine Sättigung erreicht wird.

Die Analyse der Bindung von Cox17* an Mia40 ergab generell K_D -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich, was in der gleichen Größenordnung liegt, wie der zuvor für den Komplex aus Mia40 und Tim10 bestimmte K_D von 3,3 μM (Sideris *et al.*, 2009). Die hohe Dynamik des Komplexes verhindert eine Blockade von Mia40 durch entfaltete Proteine im IMS, die keine potentiellen Substrate sind. Weiterhin wird durch die hohen Assoziations- und Dissoziationsraten ermöglicht, dass das Substrat verschiedene Bindungsmodi durchlaufen kann, bis die optimale Position zur Weiterreaktion gefunden ist.

3.3 Die räumliche Nähe von Substratbindungsstelle und aktivem Zentrum steuert die Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17

Nach der Bildung des initialen, nicht kovalenten Komplexes, kommt es zur Ausbildung eines gemischten Disulfids zwischen einem Cystein des katalytischen Disulfids in Mia40 und

einem Cystein des Substrats (Abbildung 6, Schritt 2). Da Cox17 vier strukturelle Cysteine (Cys26, 36, 47 und 57) besitzt, stellte sich die Frage, ob das gemischte Disulfid sich selektiv mit bestimmten Cysteinen bildet, oder diese sich nicht in ihrer Reaktivität unterscheiden. Um dies zu untersuchen wurden Cox17*-Varianten hergestellt, die jeweils nur ein Cystein enthalten (Cox17*_{1Cys}). Diese Varianten können daher nicht durch intramolekulare Disulfidbildung oxidiert werden, weshalb das gemischte Disulfid populiert bleibt (Abbildung 11 a). Die Cox17*_{1Cys}-Varianten wurden mit Mia40 inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat abgestoppt. Iodacetat alkyliert irreversibel freie Cysteine und verhindert dadurch weitere Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 11 b).

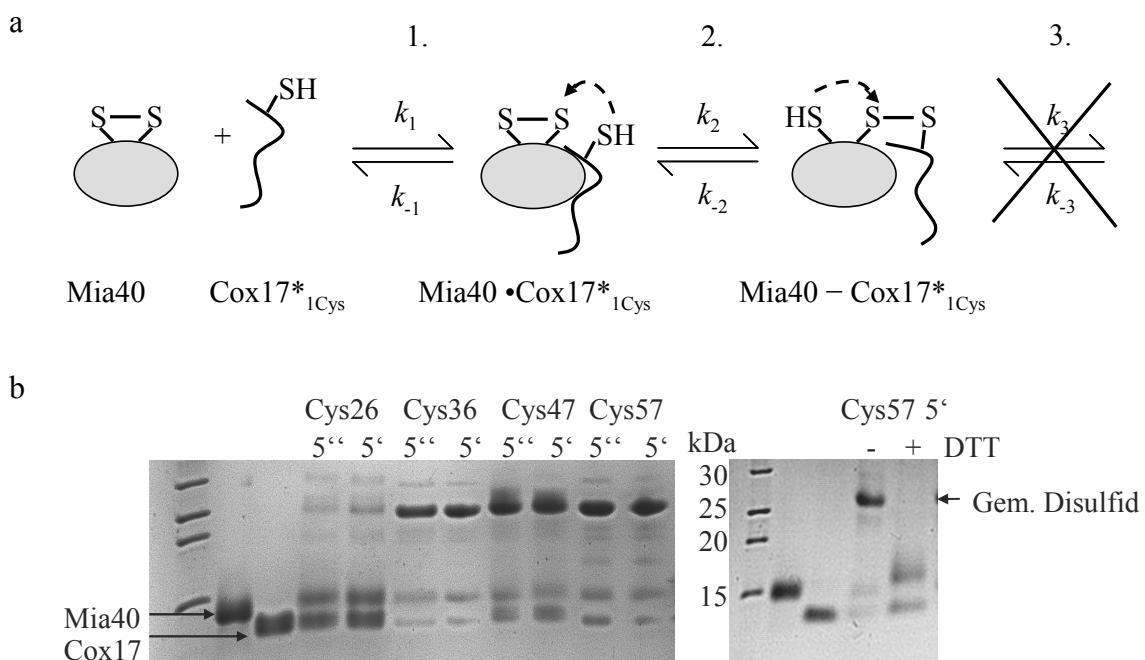


Abbildung 11: Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Eincysteinvarianten von Cox17*. (a) Gezeigt ist der schematische Ablauf der Reaktion von Mia40 mit Cox17*_{1Cys}. (b) Es wurden je 20 μM Mia40 und Cox17*_{1Cys} in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 5 s bzw. 5 min durch Zugabe von Iodacetat gestoppt und die Proben auf ein nicht reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Für Cys57 wurde die 5 min-Probe aufgeteilt und ein Teil mit DTT versetzt.

Es zeigte sich, dass die Cysteine 36, 47 und 57 sehr schnell mit Mia40 reagieren. Bereits nach 5 s ist eine deutliche Bande bei ca. 27 kDa sichtbar, die über 5 min stabil ist. Diese Bande kann durch DTT reduziert werden, weshalb es sich um einen kovalenten Komplex, also das gemischte Disulfid, handeln muss. Ein deutlicher Unterschied zu den anderen Cysteinen zeigt sich in der Reaktivität von Cys26. Das gemischte Disulfid bildet sich deutlich langsamer und nur zu einem geringeren Anteil.

Da sich das gemischte Disulfid in den meisten Fällen sehr schnell bildet sind manuelle Mischung, sowie das Blockieren der Reaktion durch Iodacetat nicht geeignet, um die Kinetik

der Reaktion zu verfolgen. Als Sonde eignet sich dagegen die Proteinfluoreszenz von Mia40. Mia40 besitzt ein Tryptophan (Trp294), das sich in direkter Nachbarschaft des katalytischen Disulfids (Cys296, Cys298) befindet. Die Tryptophanfluoreszenz wird im nativen Zustand durch die Disulfidbrücke gelöscht und nimmt daher bei Reduktion zu (Abbildung S 3).

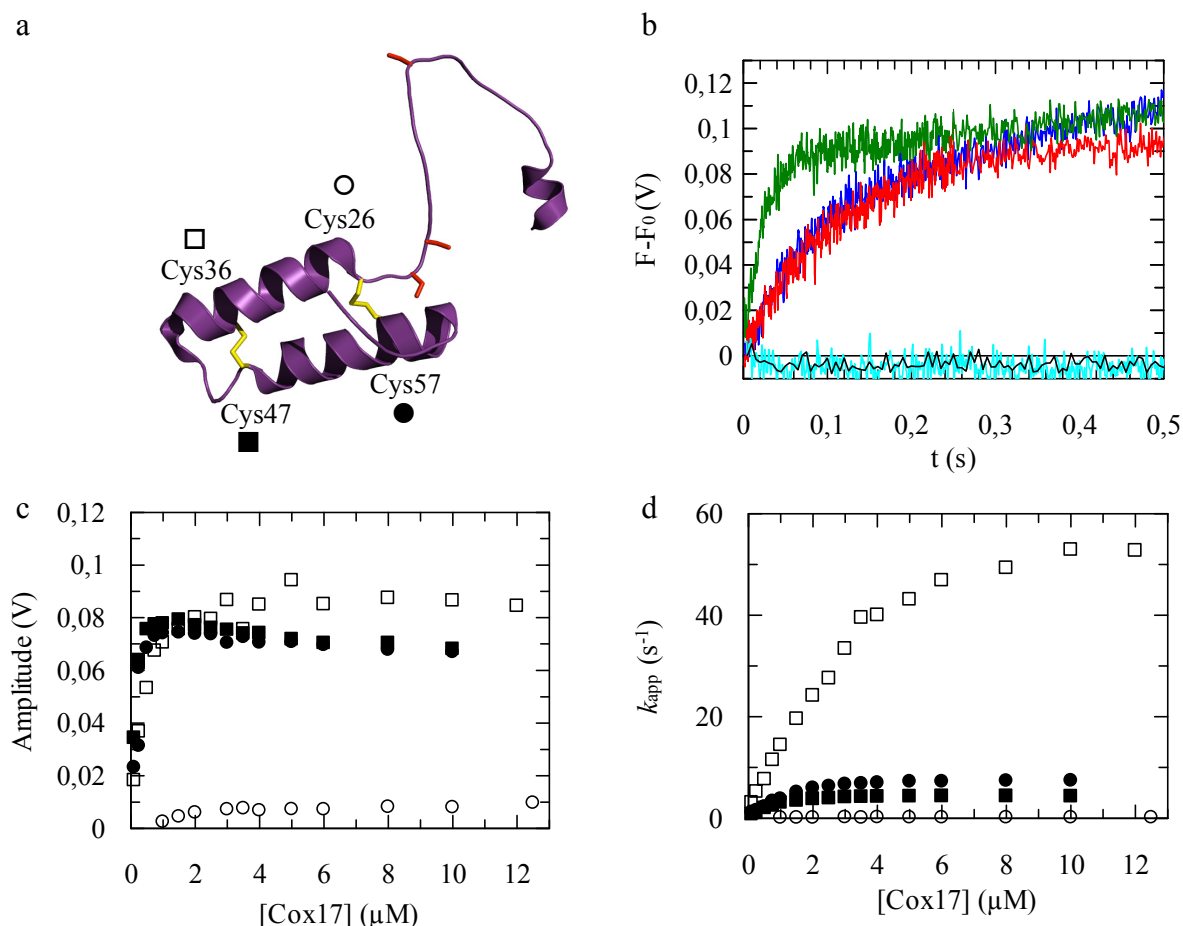


Abbildung 12: Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17*. (a) Gezeigt ist die Struktur von Cox17, wie in Abbildung 7. (b) Es wurde die Reaktion von 0,25 μ M Mia40 und je 6 μ M Cox17*_{26C} (—), Cox17*_{36C} (—), Cox17*_{47C} (—), Cox17*_{57C} (—) und Cox17*_{0SS} (—) über die integrale Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. In den gezeigten Kurven wurden die Startwerte subtrahiert. Die Fluoreszenzverläufe wurden durch monoexponentielle Funktionen mit linearem Anteil angeglichen und die Amplituden (c) und Raten (d) gegen die Konzentration an Cox17*_{26C} (○), Cox17*_{36C} (□), Cox17*_{47C} (■) und Cox17*_{57C} (●) aufgetragen.

Die Tryptophanfluoreszenz eignet sich auch als Sonde für die Ausbildung des gemischten Disulfids, obwohl hier das katalytische Disulfid nicht vollständig reduziert wird. Nach Mischung von Mia40 und Cox17*_{1Cys} konnte ein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden, nicht jedoch wenn das Substrat kein Cystein enthält (Abbildung 12 b). Die Reaktion von 0,25 μ M Mia40 mit 6 μ M Cox17*_{36C} ist extrem schnell und innerhalb von 100 ms abgeschlossen. Die vollständige Reaktion von Cox17*_{47C} und Cox17*_{57C} benötigt ca. 1 s, während sie für Cox17*_{26C} sehr langsam und unvollständig ist. Für alle Reaktionen konnte eine weitere, langsame Phase aufgezeichnet werden. Diese ist unabhängig von der Mia40-

und Cox17-Konzentration, jedoch deutlich pH-abhängig, so dass es sich um eine langsame Thiol-Disulfid-Austauschreaktion, beispielsweise eine Umlagerung auf das zweite katalytische Cystein in Mia40, handeln könnte (Abbildung S 4).

In einer weiteren Messung wurde die Mia40-Konzentration konstant gehalten und die Cox17*_{1Cys}-Konzentration variiert (Abbildung 12 c,d). Der erhaltene Ratenverlauf ist typisch für einen kinetischen Zweischritt-Mechanismus, wie in Abbildung 11 a dargestellt. Eine Assoziationsreaktion wird gefolgt von einer Isomerisierung, in diesem Fall von der Ausbildung des gemischten Disulfids. Bei niedrigen Substratkonzentrationen steigt die apparente Rate linear an, was andeutet, dass unter diesen Bedingungen die Bildung des gemischten Disulfids durch die vorangehende, nicht kovalente Assoziation limitiert wird. Die Steigung für die Reaktion von Mia40 mit Cox17*_{36C} beträgt ca. $12 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, was im Bereich der Assoziationsrate für reduziertes Cox17 liegt ($\sim 10 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$, Tabelle 1). Die Reaktion von Cox17*_{36C} und Mia40 im gebundenen Zustand ist demnach so schnell, dass sie durch die ebenfalls schnelle Komplexbildung bestimmt wird. Die nicht kovalente Komplexbildung ist für die Geschwindigkeit der Disulfidbildung sehr wichtig, da sie zu hohen lokalen Substratkonzentrationen führt. Die vergleichbare Reaktion mit Glutathion, das keinen Komplex bildet, ist daher 10^6 mal langsamer ($k = 8 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$, Abbildung S 5).

Mit steigender Substratkonzentration stellt sich ein Sättigungsverhalten ein und die Raten nehmen konstante Werte an. Bei hohen Konzentrationen wird die Assoziationsreaktion sehr schnell und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt verschiebt sich zur Ausbildung des gemischten Disulfids. Da dieser Schritt durch die vorangehende Bindungsreaktion eine monomolekulare Reaktion und damit konzentrationsunabhängig ist bleiben die Raten konstant.

Im Sättigungsbereich zeigen sich große Unterschiede in der Reaktivität der einzelnen Cysteine in Cox17*. Cys36 reagiert extrem schnell mit einer apparenten Rate von 53 s^{-1} (Tabelle 2). Cys47 und Cys57 reagieren deutlich langsamer mit apparenten Raten von $4,3 \text{ s}^{-1}$ bzw. $9,8 \text{ s}^{-1}$. Wie sich schon in der Analyse des gemischten Disulfids durch SDS-PAGE zeigte, ist Cys26 unreaktiv und bildet das gemischte Disulfid mit einer apparenten Rate von $0,12 \text{ s}^{-1}$ aus, also 400 mal langsamer, als Cys36. Neben der Rate unterscheiden sich die Varianten auch in der Amplitude der Fluoreszenzänderung (Abbildung 12 c). Die Ausbildung des gemischten Disulfids mit Cystein 36, 47 und 57 führt zu großen Fluoreszenzänderungen, während die Amplitude für Cys26 sehr klein ist. Dies bestätigt, dass sich das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17_{26C} nur zu einem kleinen Teil ausbildet.

Die Reaktivitäten der vier Cysteine in Cox17* gegenüber Mia40 unterscheiden sich also sehr stark. Im Weiteren wurde versucht eine Erklärung hierfür auf molekularer Ebene zu finden.

Tabelle 2: Parameter der Reaktion der Eincystein-Cox17*-Varianten mit Mia40 und DTNB

	Reaktion mit Mia40			Reaktion mit DTNB
	$k_{app} (s^{-1})$	Amplitude	pK _{app} -Wert	$k_{app} (s^{-1}mM^{-1})$
Cox17* _{26C}	$0,12 \pm 0,01$	$8,0 \pm 0,2$	$8,22 \pm 0,04$	$2,2 \pm 0,1$
Cox17* _{36C}	53 ± 2	87 ± 4	$7,07 \pm 0,02$	$3,5 \pm 0,3$
Cox17* _{47C}	$4,3 \pm 0,8$	68 ± 1	$7,61 \pm 0,03$	$3,5 \pm 0,2$
Cox17* _{57C}	$9,8 \pm 0,3$	67 ± 1	$7,57 \pm 0,04$	$4,8 \pm 0,2$

Es wurde die Reaktion von 0,25 μ M Mia40 und Cox17*_{1Cys}, wie in Abbildung 12 beschrieben, verfolgt. Angegeben sind die apparente Rate, sowie die Amplitude der Reaktion im Sättigungsbereich bei 10 μ M Cox17*_{1Cys}. Die pK-Werte wurden aus der pH-Abhängigkeit der Reaktion von Cox17*_{1Cys} und Mia40, wie in Abbildung 15 beschrieben, ermittelt. Die Ratenkonstanten zweiter Ordnung der Reaktion mit DTNB wurden wie in Abbildung 14 gezeigt bestimmt. Angegeben ist die Standardabweichung des Datenangleichs.

3.3.1 Die intrinsische Reaktivität der Cysteine in Cox17

Die chemische Reaktivität von Aminosäuren wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Eine wichtige Rolle spielt die Zugänglichkeit, die beispielsweise durch die Sekundärstruktur vermindert werden kann. Um dies zu untersuchen wurden CD-Spektren der Cox17*_{1Cys}-Varianten gemessen (Abbildung 13). Es zeigte sich, dass alle Varianten, genau wie cysteinfreies Cox17*, entfaltet vorliegen. Daher ist die Reaktivität vermutlich nicht deutlich durch sterische Einflüsse verändert.

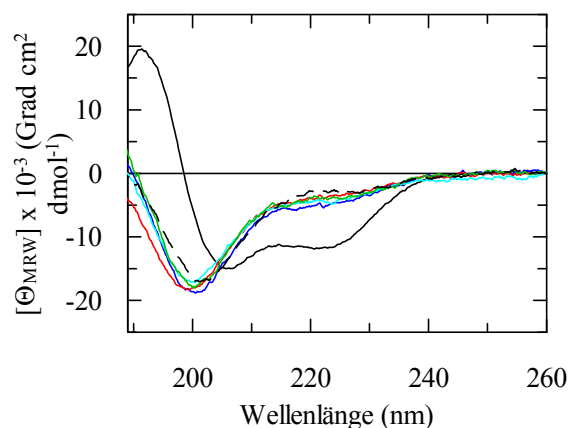


Abbildung 13: Sekundärstruktur verschiedener Cox17*-Varianten. Gezeigt sind die CD-Spektren von je 4 μ M Cox17* (—), Cox17*_{26C} (—), Cox17*_{36C} (—), Cox17*_{47C} (—), Cox17*_{57C} (—) und Cox17*_{0SS} (---) bei 15 °C, gemessen in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4. Es wurden jeweils zehn Einzelspektren aufgezeichnet und gemittelt.

Die Wechselwirkung der Cysteine mit umgebenden Resten kann ebenfalls die Reaktivität beeinflussen. Es wurde daher die Reaktion mit einem niedermolekularen Reagenz untersucht. Hierfür eignet sich DTNB, oder Ellmans Reagenz, das mit zugänglichen Cysteinen reagiert

und dabei zu einer Gelbfärbung führt, was anhand der Absorptionsänderung bei 412 nm verfolgt werden kann (Abbildung 14 a). Die Reaktion mit DTNB zeigte, dass sich die chemischen Reaktivitäten der Cysteine nur unwesentlich unterscheiden. Die Ratenkonstanten zweiter Ordnung liegen zwischen $2,2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ für Cox17*_{26C} und $4,8 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ für Cox17*_{57C} und können die 400-fach verringerte Reaktivität von Cys26 gegenüber Cys36 nicht erklären (Tabelle 2).

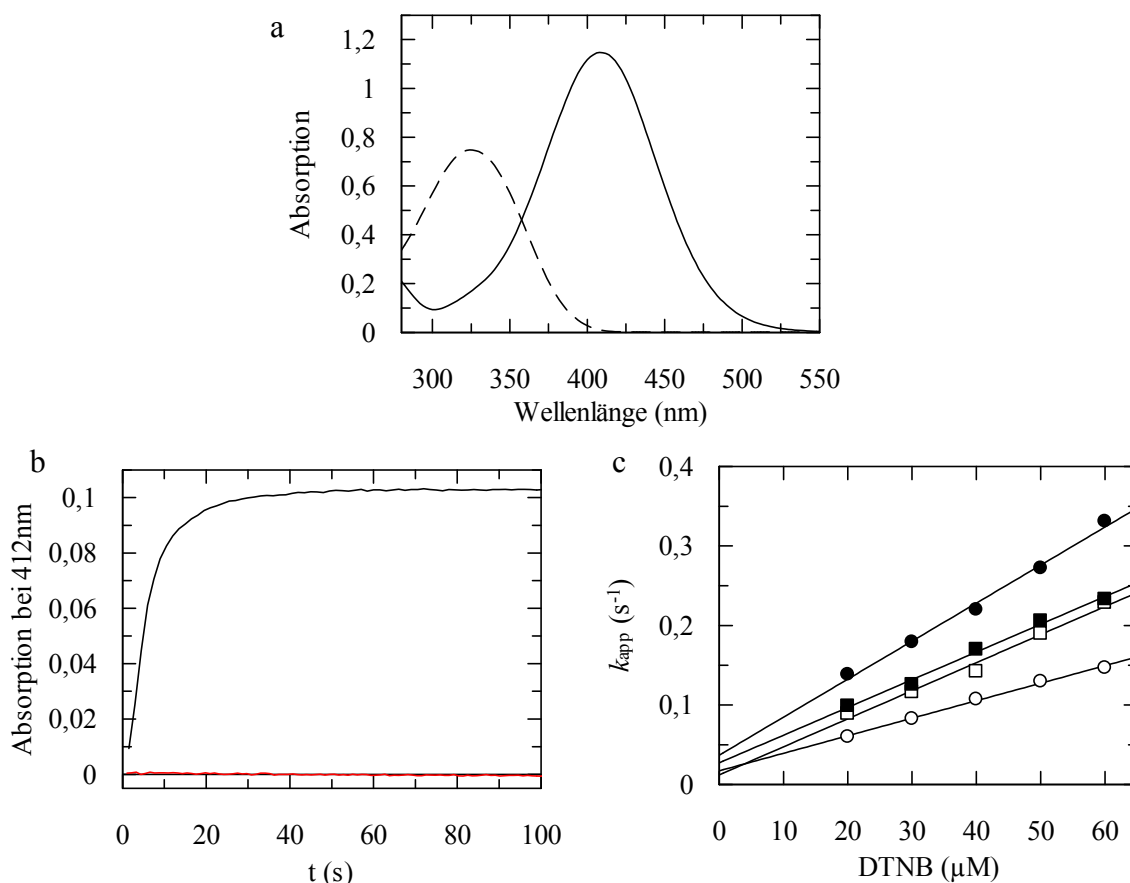


Abbildung 14: Reaktion von Cox17* mit DTNB. (a) Die Absorption von $50 \mu\text{M}$ DTNB (---) verschiebt sich langwellig bei Reduktion zu TNB (—). (b) Gezeigt ist die Reaktion von $50 \mu\text{M}$ DTNB mit je $5 \mu\text{M}$ Cox17*_{08S} (—) und Cox17*_{36C} (—) verfolgt anhand der Absorptionsänderung bei 412 nm. (c) Es wurden monoexponentielle Funktionen an die Absorptionsverläufe angeglichen und die Raten für Cox17*_{26C} (\circ), Cox17*_{36C} (\square), Cox17*_{47C} (\blacksquare) und Cox17*_{57C} (\bullet) gegen die DTNB-Konzentration aufgetragen. Die linearen Angleiche an die Datenpunkte ergeben Ratenkonstanten zweiter Ordnung, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

3.3.2 Die Ionisierungseigenschaften von Cox17

Das gemischte Disulfid bildet sich durch den nukleophilen Angriff eines Thiolatanions des Substrats am katalytischen Disulfid von Mia40. Daher hängt die Reaktivität des Substratcysteins vom Ausmaß der Deprotonierung und damit von seinem pK-Wert ab. Um zu untersuchen, ob sich die vier Cysteine von Cox17* hierin unterscheiden, wurde die pH-Abhängigkeit ihrer Reaktion mit Mia40 untersucht. Die Bedingungen wurden so gewählt,

dass die Ausbildung des gemischten Disulfids geschwindigkeitsbestimmend ist, was bei hohen Substratkonzentrationen der Fall ist.

Zunächst wurde untersucht, ob die nicht kovalente Komplexbildung vom pH-Wert beeinflusst wird. Es zeigte sich, dass die nicht kovalente Bindung bei allen untersuchten pH-Werten annähernd gleich schnell abläuft und daher die nachfolgende Reaktion nicht beeinflussen sollte (Abbildung S 6). Die Ausbildung des gemischten Disulfids hingegen wird mit steigendem pH-Wert schneller. Da wegen des großen pH-Bereichs zwei verschiedene Puffer (Phosphat und Tris) verwendet werden mussten, wurden die Raten im Überlappungsbereich für beide Puffer bestimmt, um Einflüsse der Puffersubstanz auf die Reaktion auszuschließen. Die Verläufe der Ratenkonstanten der Ausbildung des gemischten Disulfids folgen den Titrationskurven der einzelnen Cysteine (Abbildung 15). Es ergeben sich apparente pK-Werte, die durch die pK-Werte der Cysteine des katalytischen Disulfids in Mia40 beeinflusst werden. Dieser Einfluss ist jedoch für alle vier Cox17*-Cysteine gleich, daher können diese apparenten pK-Werte für einen Vergleich der Reaktivitäten herangezogen werden. Die so ermittelten pK_{app} -Werte variieren zwischen 7,1 für Cys36 und 8,2 für Cys26 (Tabelle 2). Bei pH 9 dominiert für alle Cysteine die deprotonierte Form, dennoch unterscheiden sich die Ratenkonstanten stark voneinander. Die Ionisierungseigenschaften der Cysteine in Cox17* sind demnach nicht für die enormen Unterschiede in der Reaktivität gegenüber Mia40 verantwortlich.

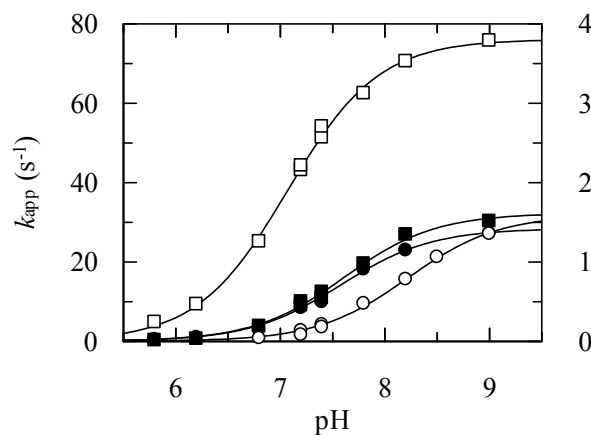


Abbildung 15: Bestimmung der pK-Werte der einzelnen Cysteine von Cox17* anhand der Reaktion mit Mia40. Es wurde die Reaktion von 0,25 μM Mia40 und 15 μM Cox17*_{1Cys} über die integrale Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm bei 15 °C verfolgt. Die Fluoreszenzverläufe wurden durch monoexponentielle Funktionen mit linearem Anteil angeglichen und die Raten für Cox17*_{26C} (○), Cox17*_{36C} (□), Cox17*_{47C} (■) und Cox17*_{57C} (●) gegen den pH-Wert aufgetragen. Die Datenpunkte für Cox17*_{26C} sind mit der rechten Ordinate assoziiert. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich durch Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 8), die erhaltenen pK-Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat pH 5,8, 6,2, 6,8, 7,2 und 7,4, sowie in 0,1 M Tris/HCl pH^{15 °C} 7,2, 7,4, 7,8, 8,2 8,5 und 9 durchgeführt.

3.3.3 Die MISS/ITS Sequenz beeinflusst die Komplexbildung

Die Reaktivitäten der vier Cysteine in Cox17* gegenüber Mia40 weisen große Unterschiede auf, die weder durch unterschiedliche Zugänglichkeit, noch durch veränderte chemische Reaktivität erklärt werden können (Abbildung 14, Abbildung 15). Die Ursache muss daher mit der spezifischen Interaktion von Mia40 und Cox17* zusammenhängen. Beispielsweise könnte die Proteinkette von Cox17* im Komplex mit Mia40 so ausgerichtet sein, dass der Abstand des katalytischen Disulfids von Mia40 zu bestimmten Cysteinen gering ist und die Reaktion begünstigt wird. Interessanterweise ist der Energietransfer bei Komplexbildung zwischen Mia40 und Cox17*_{26C}-AEDANS sehr viel kleiner, als wenn der Donor mit anderen Cysteinen verknüpft ist (Abbildung S 2 b). Dies deutet darauf hin, dass insbesondere das unreaktive Cys26 weit entfernt vom aktiven Zentrum gebunden wird.

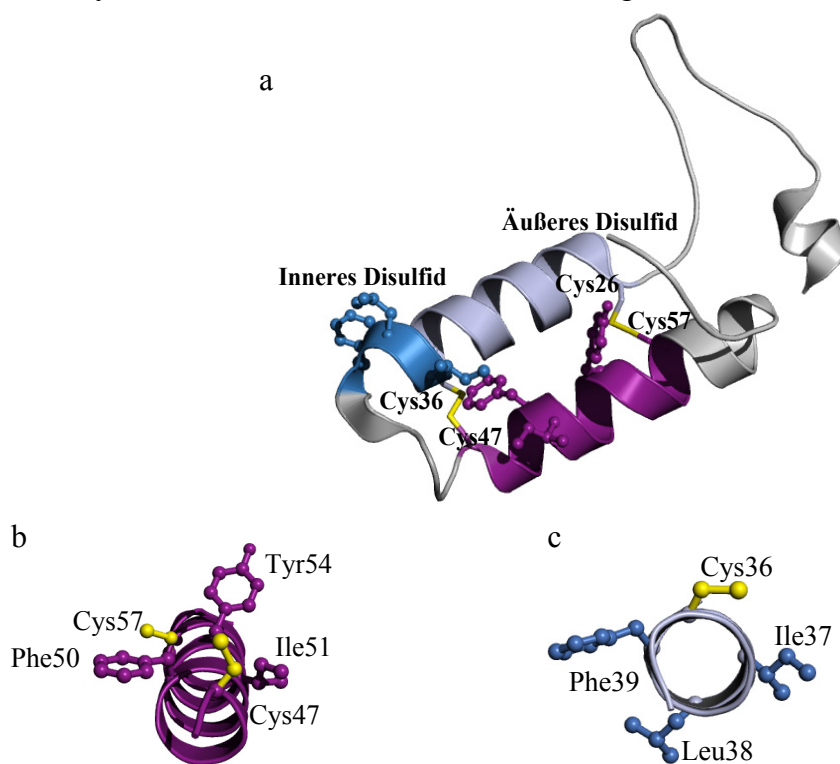


Abbildung 16: Raumstruktur und wichtige Reste von Cox17 aus Hefe. (a) Gezeigt ist die Struktur von Cox17, wobei Schwefelatome der strukturellen Disulfide gelb eingefärbt sind. Das erste CX₉C-Motiv (Reste 26-33) ist violett, das zweite CX₉C-Motiv (Reste 47-57) magenta und die hydrophoben Reste 37-39 blau. Die Reste der MISS/ITS-Sequenz (Phe50, Ile51, Tyr54), sowie Ile37, Leu38 und Phe39 sind in *balls and sticks* Repräsentation gezeigt. (b) Ansicht der zweiten Helix (Aminosäuren 46-62). Die Reste der MISS/ITS-Sequenz und die Cysteine sind als Stäbchen gezeigt. (c) Aufsicht auf die erste Helix (Aminosäuren 31-40), die Orientierung ist vom N- zum C-Terminus. Die Reste der ILF-Sequenz und Cys36 sind als Stäbchen gezeigt. Nummerierungen sind gemäß der Aminosäuresequenz. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol und dem pdb-Eintrag 1U97 erstellt.

Die Interaktion von Mia40 und Cox17 war in einer früheren Arbeit durch Importexperimente charakterisiert worden (Sideris *et al.*, 2009). Hierbei wurden radioaktiv markierte Cox17-Varianten verwendet, in denen, einzeln oder kombiniert, Cysteine gegen Serine ausgetauscht waren. Die reduzierten Proteine wurden zu isolierten Mitochondrien gegeben und über SDS-

PAGE analysiert, wie viel markiertes Cox17 in den Intermembranraum importiert wurde. Diese Experimente führten zu dem Schluss, dass Cys57 und nicht Cys36, das kinetisch bevorzugt ist, essentiell für die Ausbildung eines langlebigen gemischten Disulfids mit Mia40 ist. Sideris *et al.* begründeten die bevorzugte Reaktion von Mia40 mit Cys57 durch die benachbarte ITS-Sequenz (*import and targeting signal*), die in ähnlicher Form auch für Tim9 gefunden und als MISS-Sequenz (*mitochondrial import and sorting signal*) bezeichnet worden war (Milenkovic *et al.*, 2009). Die MISS/ITS-Sequenz ist ein Sequenzmotiv, das in den meisten bisher bekannten Mia40 Substraten vorhanden ist. Es handelt sich um drei hydrophobe Reste, die sich an Position 3, 4 und 7 vor oder nach einem Cystein befinden. In der Helixprojektion zeigen diese Reste in Richtung des Cysteins (Abbildung 16 b) und sollen so die Interaktion mit der hydrophoben Furche von Mia40 vermitteln („*sliding*“-Schritt). Durch spezifische Wechselwirkungen soll auf diese Weise ein Cystein in Nachbarschaft zum katalytischen Disulfid gebracht werden um die Ausbildung des gemischten Disulfids zu erleichtern („*docking*“-Schritt).

Phe50 und Ile51 sind die zentralen Reste der MISS/ITS-Sequenz (Abbildung 16 a,b). Um deren Einfluss auf die Reaktivität der Cysteine zu untersuchen, wurden sie in den Cox17*-Varianten mit je einem Cystein an den Positionen 36, 47 und 57 durch Ala ersetzt. Eine Liste mit den Sequenzen aller verwendeten Cox17*-Varianten ist in Tabelle S 2 angegeben. Die Cox17*_{1Cys}50A51A-Varianten wurden zunächst mit AEDANS markiert und die Assoziation mit Mia40 untersucht (Abbildung 17). Die hydrophoben Reste der MISS/ITS-Sequenz beeinflussen die Komplexbildung mit Mia40. In allen untersuchten Varianten ist die Affinität deutlich verschlechtert (Faktor 10-60), was in erster Linie an einer 20-60-fach verringerten Assoziationsrate liegt (Tabelle 3). Gleichzeitig sind die Amplituden gegenüber dem Wildtyp-Protein sehr stark verringert, was darauf hindeutet, dass sich die Ausrichtung von Cox17* relativ zum katalytischen Zentrum von Mia40 verändert hat (Abbildung S 7).

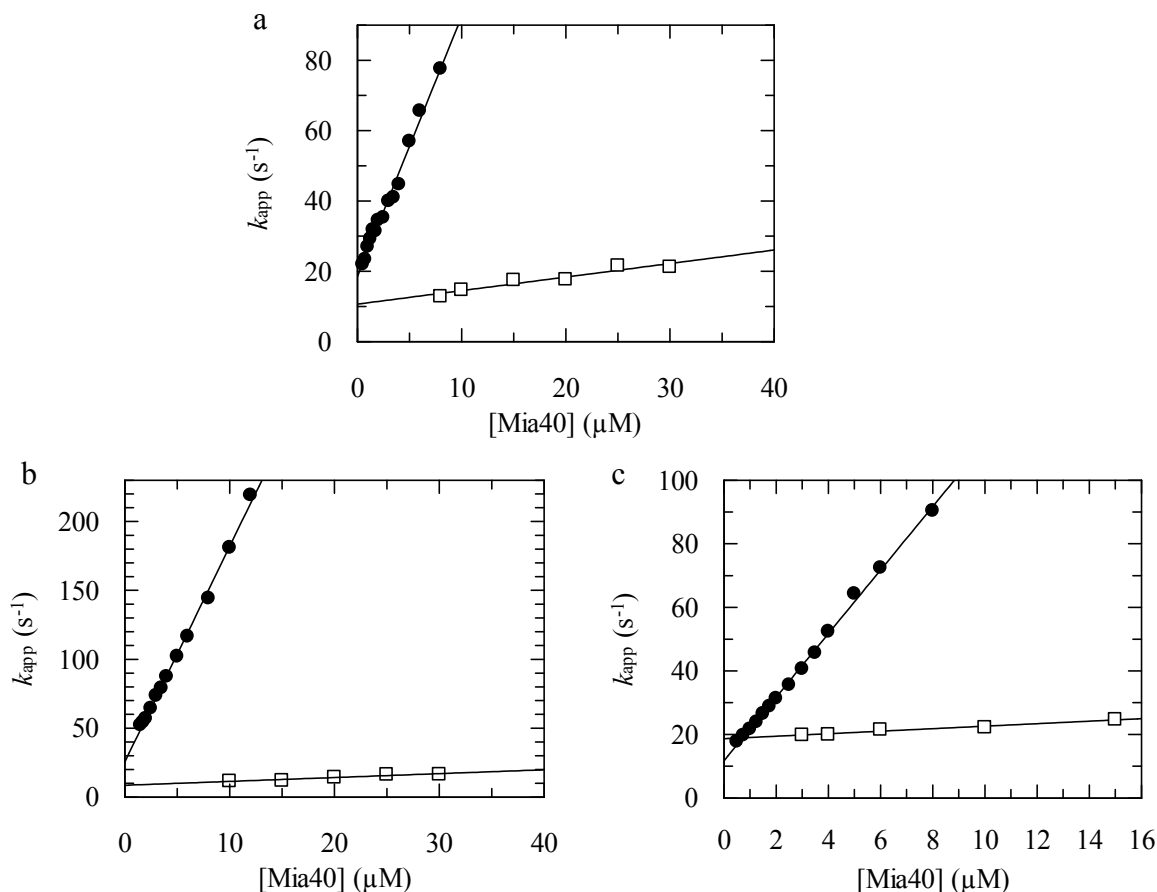


Abbildung 17: Einfluss der MISS/ITS-Sequenz in Cox17* auf die Komplexbildung mit Mia40. Es wurde die Reaktion von Mia40 und je 0,5 μM (a) Cox17*_{36C}-AEDANS (●) und Cox17*_{36C}50A51A-AEDANS (□), (b) Cox17*_{47C}-AEDANS (●) und Cox17*_{47C}50A51A-AEDANS (□) und (c) Cox17*_{57C}-AEDANS (●) und Cox17*_{57C}50A51A-AEDANS (□) anhand der Fluoreszenzänderung oberhalb von 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Raten gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die entsprechenden Amplituden sind in Abbildung S 7 gezeigt. Die durchgezogenen Linien entsprechen einer linearen Regression der Raten. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Alle Messungen wurden bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA durchgeführt.

Anschließend wurde die Ausbildung des gemischten Disulfids der Varianten mit Mia40 untersucht (Abbildung 18). Hier waren die Effekte weniger stark ausgeprägt. Die apparenten Raten der Ausbildung des gemischten Disulfids mit 10 μM Cox17* sind nur zweifach für Cys36 und fünffach für Cys57 verringert. Hierbei ist wichtig, dass nicht nur die Cysteine, die die MISS/ITS-Sequenz umgeben, beeinflusst sind, sondern auch das weiter entfernte Cys36, das jedoch nach wie vor die höchste Reaktionsrate zeigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MISS/ITS-Sequenz vor allem für die Substrataffinität bei der Ausbildung des nicht kovalenten Komplexes eine entscheidende Rolle spielt, jedoch für die Selektivität der Ausbildung des gemischten Disulfids weniger wichtig ist.

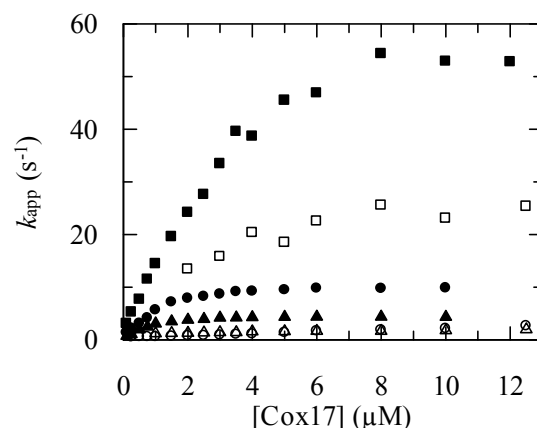


Abbildung 18: Einfluss der MISS/ITS-Sequenz in Cox17* auf die Ausbildung des gemischten Disulfids mit Mia40. Es wurde die Reaktion von 0,25 μM Mia40 und Cox17*_{36C} (■), Cox17*_{36C}50A51A (□), Cox17*_{47C} (▲), Cox17*_{47C}50A51A (△), Cox17*_{57C} (●) und Cox17*_{57C}50A51A (○) anhand der Fluoreszenzänderung über 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen mit linearem Anteil angeglichen und die Raten gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die entsprechenden Amplituden sind in Abbildung S 8 gezeigt und die erhaltenen Parameter in Tabelle 3 zusammengefasst. Alle Messungen wurden bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA durchgeführt.

Nach dem *sliding* und *docking* Modell, das nach aktuellem Stand die Interaktion zwischen Mia40 und Substraten beschreibt, sorgt die MISS/ITS-Sequenz in Cox17 aus Hefe für die bevorzugte Reaktion von Cys57 mit dem katalytischen Disulfid in Mia40 (Sideris *et al.*, 2009). Die hier durchgeführte Analyse der Bedeutung der MISS/ITS-Sequenz für die nicht kovalente Bindung und die Ausbildung des kovalenten Intermediats ergab jedoch, dass die MISS/ITS-Sequenz eine untergeordnete Rolle bei der Aktivierung von Cysteinen für den Angriff am katalytischen Disulfid in Mia40 spielt. Stattdessen sind die hydrophoben Aminosäuren der MISS/ITS-Sequenz für die nicht kovalente Assoziation wichtig.

Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse ergibt sich aus dem Versuchsaufbau der Importexperimente, anhand derer die MISS/ITS-Sequenz identifiziert wurde. Es wurden radioaktiv markierte Cox17-Varianten, die unterschiedliche Kombinationen an Cysteinen enthielten, mit isolierten Mitochondrien inkubiert und die Bandenintensität des gemischten Disulfids mit Mia40 im IMS analysiert. Die Cysteine wurden jedoch zum Zeitpunkt der Probennahme nicht durch kovalente Modifikation blockiert, so dass eine Weiterreaktion sowohl während der Aufarbeitung, als auch während der Gelelektrophorese möglich war. Hierdurch könnten artifizielle Ergebnisse zustande kommen. Weiterhin wurde in erster Linie das Vorhandensein der Bande des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17 als Beweis für eine Interaktion der beiden Proteine gewertet. Diese war besonders intensiv wenn Cys57 in Cox17 vorhanden war. Es wurde aber nicht berücksichtigt, dass in den meisten Importexperimenten auch ohne Cys57 erhebliche Mengen von Cox17 im Intermembranraum vorlagen, was nach gängiger Meinung nur durch Interaktion mit Mia40 möglich ist, da reduziertes und entfaltetes Cox17 durch die TOM-Pore ins Cytosol zurück diffundieren kann. Varianten, die nicht durch intramolekulare Oxidation

im IMS gehalten werden konnten, da sie nur ein Cystein enthielten, wurden durch Mia40 zu kovalenten Homodimeren oxidiert. Somit wurde durch die Importexperimente nicht notwendigerweise das reaktivste Cystein in Cox17 bestimmt, sondern dasjenige das die langlebigsten Intermediate bildet, auch wenn diese nicht unbedingt produktiver Natur sind.

3.3.4 Die Reaktivität von Cys36 wird durch benachbarte hydrophobe Reste bestimmt

Das katalytische Disulfid und die hydrophobe Bindungsfläche in Mia40 sind direkt benachbart. Die Reaktivität eines Substratcysteins könnte daher durch die Hydrophobizität in seiner unmittelbaren Umgebung bestimmt sein. Cox17 ist ein sehr polares Protein und hydrophobe Aminosäuren kommen nur vereinzelt vor. Die einzige Ausnahme, neben Phe50 und Ile 51, bilden die Reste Ile37-Leu38-Phe39 (ILF), die interessanterweise direkt neben dem hochreaktiven Cys36 liegen (Abbildung 16 a).

Um die Bedeutung dieser Reste zu untersuchen, wurden sie gegen Ala ausgetauscht. Durch diese Substitutionen wird die Affinität zu Mia40 10-fach verschlechtert (Abbildung 19 a, Tabelle 3), was vor allem an einer schnelleren Dissoziation des Komplexes liegt. Die Verringerung der Affinität ist darauf zurückzuführen, dass die ohnehin recht geringe Hydrophobizität von Cox17 durch die Ala-Substitutionen stark verringert wird. Die sehr kleine Amplitude der Bindungsreaktion deutet weiterhin an, dass diese Variante in einer anderen Orientierung gebunden wird als das Wildtyp-Protein und der AEDANS-Rest nun weiter von Trp294 und damit vom katalytischen Zentrum entfernt liegt (Abbildung S 9). Sehr viel stärker als die nicht kovalente Bindung ist die Reaktivität von Cys36 bei der Ausbildung des gemischten Disulfids mit dem katalytischen Disulfid in Mia40 beeinflusst (Abbildung 19 b). Die apparente Rate dieser Reaktion im Wildtyp-Protein beträgt ca. 53 s^{-1} und ist nach Substitution der ILF-Sequenz an den Positionen 37-39 durch AAA um Faktor 300 auf $0,17 \text{ s}^{-1}$ herabgesetzt. Damit liegt sie im Bereich des Wertes für Cox17*_{26C}. Der Verlauf der Ratenkonstanten zeigt kein Sättigungsverhalten mehr, sondern ist über den gesamten Konzentrationsbereich konstant. Dies weist darauf hin, dass der Austausch der hydrophoben Umgebung von Cys36 die Reaktivität so stark verringert, dass nun nicht mehr die Ausbildung des nicht kovalenten Komplexes, sondern die Bildung der kovalenten Bindung geschwindigkeitsbestimmend ist. In der Helixprojektion wird deutlich, dass die Reste der ILF-Sequenz im gefalteten Zustand von Cys36 abgewandt positioniert sind (Abbildung 16 c). Das Ergebnis, dass sie dennoch die Reaktivität dieses Cysteins so stark erhöhen deutet eher darauf hin, dass Cox17* im entfalteten Zustand an Mia40 bindet und die hydrophoben Reste sich so in direkter räumlicher Nähe zu Cys36 befinden.

Zusätzlich wurden die Ala-Substitutionen an den Positionen 37-39 auch in Cox17*_{57C} eingeführt. Diese verschlechterten die Bindung ebenfalls (Abbildung 19 c), führten jedoch nicht zu einer Ab-, sondern sogar zu einer Zunahme der Amplitude (Abbildung S 9). Die Rate der Ausbildung des gemischten Disulfids war in dieser Variante etwa doppelt so groß, wie im Ausgangskonstrukt (Abbildung 19 d). Zusammengefasst unterstützen diese Ergebnisse

die Vermutung, dass die Reste Ile37, Leu38 und Phe39 in der Nähe des aktiven Zentrums von Mia40 binden. Dies führt im Wildtyp-Protein zu einer Konkurrenz mit der MISS/ITS-Sequenz um den Bindungsplatz. In der ILF→AAA-Variante ist diese Konkurrenz nicht mehr vorhanden, so dass die MISS/ITS-Sequenz näher am aktiven Zentrum bindet und so die Reaktivität von Cys57 erhöht

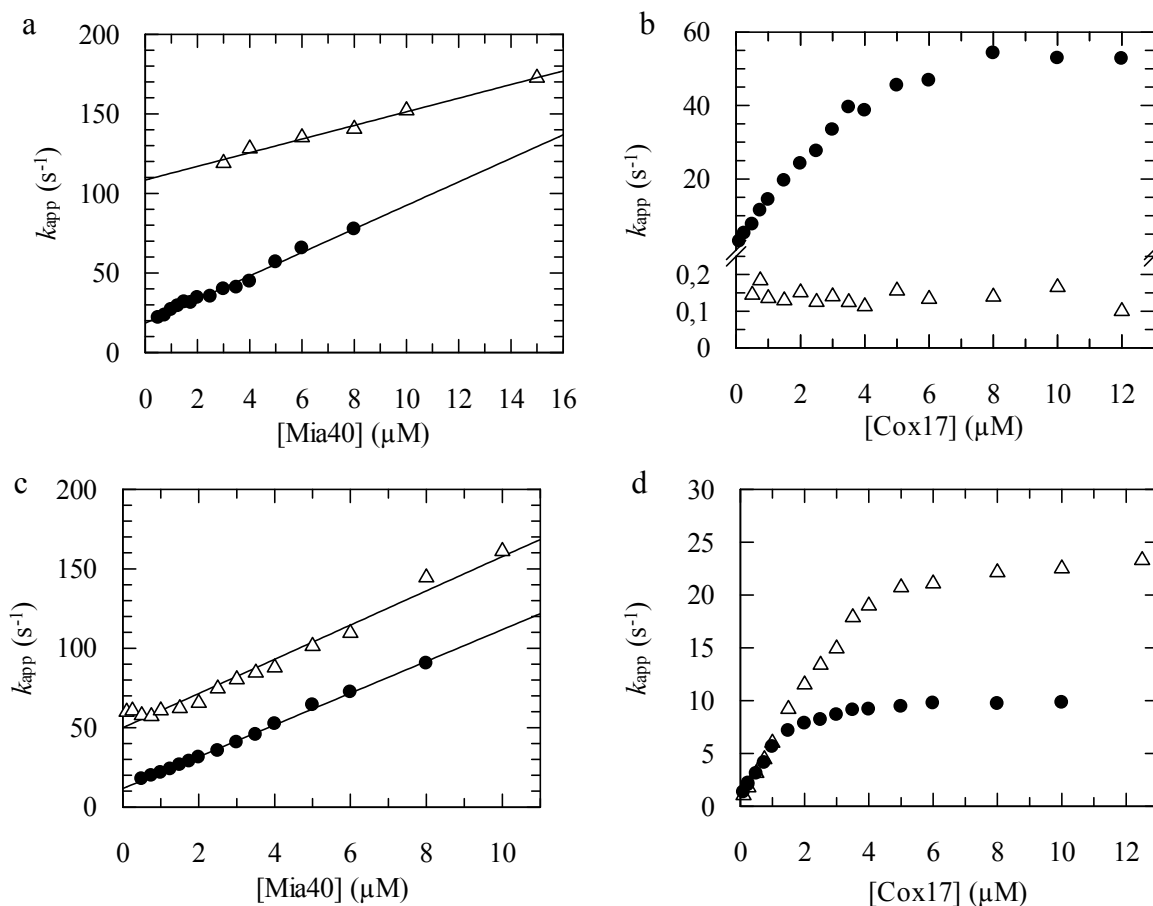


Abbildung 19: Einfluss der Reste Ile37, Leu38, Phe39 auf die Reaktivität von Cox17*. Es wurde die Reaktion von Mia40 und je 0,5 μM (a) Cox17*_{36C}-AEDANS (●) und Cox17*_{36C}37A38A39A-AEDANS (Δ) bzw. (c) Cox17*_{57C}-AEDANS (●) und Cox17*_{57C}37A38A39A-AEDANS (Δ) anhand der Fluoreszenzänderung über 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Raten gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einer linearen Regression der Raten. Weiterhin wurde die Ausbildung des gemischten Disulfids von 0,25 μM Mia40 und (b) Cox17*_{36C} (●) und Cox17*_{36C}37A38A39A (Δ) bzw. (d) Cox17*_{57C} (●) und Cox17*_{57C}37A38A39A (Δ) anhand der integralen Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Alle Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die entsprechenden Amplituden sind in Abbildung S 9 gezeigt und die erhaltenen Parameter in Tabelle 3 zusammengefasst.

3.3.5 Hydrophobe Reste in der Umgebung von Cys26 erhöhen die Reaktivität

Die Analyse der Umgebung von Cys36 ergab, dass die direkte hydrophobe Umgebung für die hohe Reaktivität verantwortlich ist und die Reste Ile37, Leu38, Phe39 stärker als die MISS/ITS-Sequenz für die Ausrichtung des Substrats hin zum katalytischen Zentrum von Mia40 verantwortlich sind.

Um zu untersuchen, ob die äußerst geringe Reaktivität von Cys26 durch Veränderungen in der chemischen Natur der umgebenden Reste verbessert werden kann, wurden zunächst die drei Reste der MISS/ITS-Sequenz (Phe50, Ile51 und Tyr 54) an den entsprechenden Positionen nach Cys26 eingeführt (E29F, K30I, R33Y). Die Affinität zu Mia40 wurde von diesen Substitutionen nicht beeinflusst (Abbildung 20 a, Tabelle 3). Die apparente Rate der Ausbildung des gemischten Disulfids wurde 6-fach erhöht, war damit jedoch immer noch 90 mal langsamer, als für Cys36 (Abbildung 20 b).

Die E29F K30I R33Y-Variante enthält zwei MISS/ITS-Sequenzen, nämlich die Wildtyp-Sequenz zwischen den Cysteinen 47 und 57, sowie die nachträglich nach Cys26 eingefügte. Dies könnte dazu führen, dass die beiden Erkennungssequenzen miteinander konkurrieren und so die Effekte auf Cys26 gering bleiben. Daher wurde in MISS-Swap-Varianten, die entweder Cys26 oder 57 enthalten, die gesamte Sequenz des ersten CX₉C-Motivs (Reste 27-35) gegen die Sequenz des zweiten CX₉C-Motivs (Reste 48-56) ausgetauscht. Damit wurde die MISS/ITS-Sequenz von Cys57 weg und in direkte Nachbarschaft zu Cys26 gebracht.

In beiden Cox17*-Varianten war die Dissoziationskonstante für den nicht kovalenten Komplex aus Mia40 und dem Substrat annähernd unverändert, vermutlich da die Hydrophobizität von Cox17*, die für die Affinität entscheidend ist, durch die Sequenzverschiebungen nicht verändert wurde (Abbildung 20 a,c, Tabelle 3). Ein sehr großer Unterschied ergab sich jedoch für die Amplitude der Bindungsreaktion. Wenn der FRET-Akzeptor in den MISS-swap-Varianten mit Cys57 verknüpft war, war die Amplitude 20-fach kleiner, als im Wildtyp-Hintergrund. War der Akzeptor jedoch an Cys26 gekoppelt, war die Amplitude 20-fach erhöht (Abbildung S 10). Da die Amplitude vor allem vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängt und die Veränderung sehr groß ist, ist es wahrscheinlich, dass sich die Orientierung des nicht kovalenten Komplexes durch die Sequenzverschiebung verändert hat. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein scheint Cys26 durch die MISS/ITS-Sequenz in seiner Nachbarschaft sehr viel näher am aktiven Zentrum gebunden zu sein. Dieser veränderte Bindungsmodus führt dazu, dass Cys26 400-fach schneller zum gemischten Disulfid weiter reagiert, als die Ausgangsvariante, während die Rate der Reaktion von Cys57 6-fach verlangsamt ist.

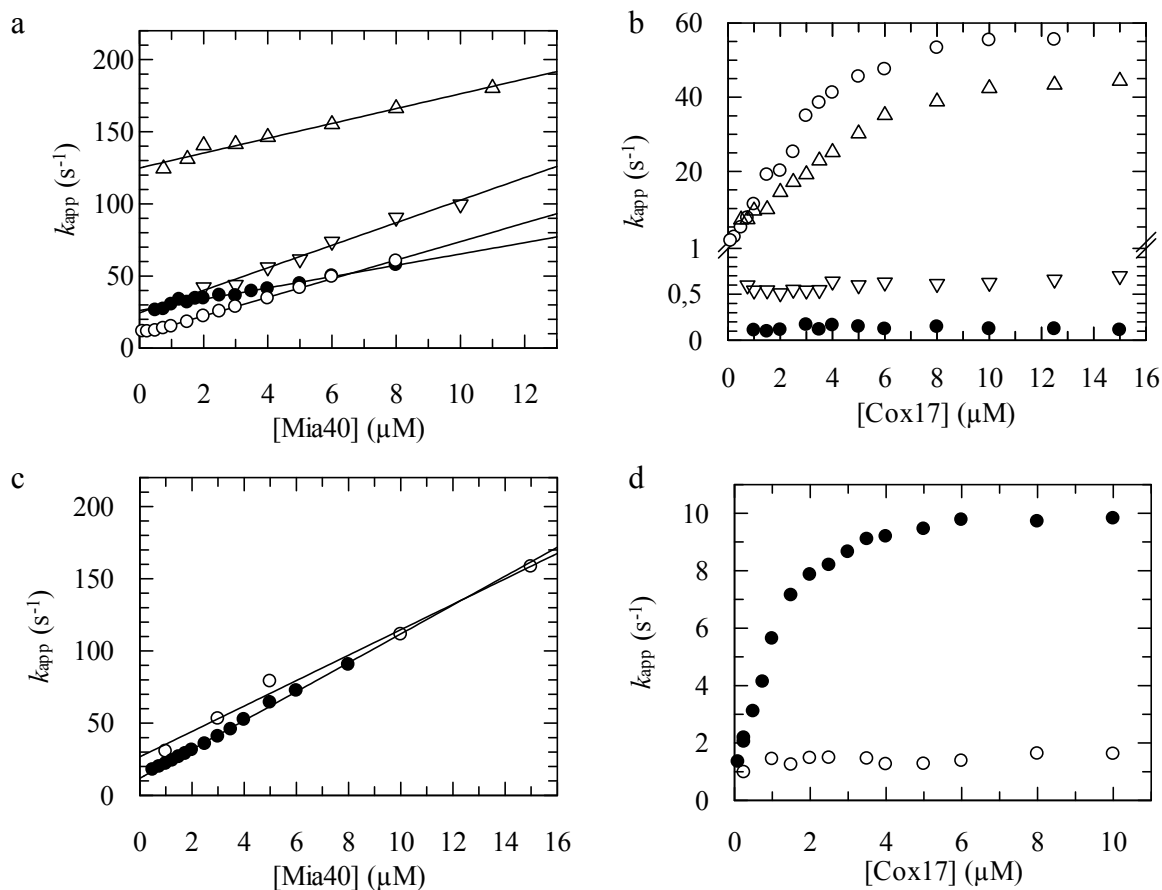


Abbildung 20: Einfluss der Umgebung von Cys26 auf die Reaktivität. Es wurde die Reaktion von Mia40 und je 0,5 μM (a) Cox17*_{26C}-AEDANS (●), Cox17*_{26C}27I28L29F-AEDANS (▲), Cox17*_{26C}MISS-swap-AEDANS (○) und Cox17*_{26C}29F30I33Y-AEDANS (▼) bzw. (c) Cox17*_{57C}-AEDANS (●) und Cox17*_{57C}MISS-swap-AEDANS (○) anhand der Fluoreszenzänderung über 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Raten gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einer linearen Regression der Raten. Weiterhin wurde die Ausbildung des gemischten Disulfids von 0,25 μM Mia40 und (b) Cox17*_{26C} (●), Cox17*_{26C}27I28L29F (▲), Cox17*_{26C}MISS-swap (○) und Cox17*_{26C}29F30I33Y (▼) bzw. (d) Cox17*_{57C} (●) und Cox17*_{57C}MISS-swap (○) über die integrale Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Alle Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die entsprechenden Amplituden sind in Abbildung S 10 gezeigt und die erhaltenen Parameter in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die MISS-swap-Varianten zeigten, dass sich die sehr geringe Reaktivität von Cys26 durch Modulation seiner Umgebung stark verbessern lässt. Für Cys36 wurde gefunden, dass die benachbarten Reste Ile, Leu, Phe für die hohe Reaktivität verantwortlich sind. Daraus folgte die Frage, ob diese Reste auch Cys26 aktivieren können. In einer weiteren Variante wurde daher die ILF-Sequenz von den Positionen 37-39 nach Cys36 an die Positionen 27 bis 29 nach Cys26 verschoben. Entsprechend wurden die ursprünglichen Reste an Position 27-29, Lys, Pro und Glu, nun an Position 37-39 eingeführt. Diese Aminosäureverschiebung führte zu einer enormen Verbesserung der Aktivität von Cys26 (Abbildung 20 b, Tabelle 3). Die Rate der Ausbildung des gemischten Disulfids konnte von 0,12 s^{-1} auf 43 s^{-1} gesteigert werden, was annähernd der Reaktivität von Cys36 in seiner natürlichen Sequenzumgebung entspricht.

Diese extreme Aktivierung von Cox17*_{26C}, sowie der starke Verlust an Reaktivität von Cox17*_{36C37A38A39A} unterstreichen die Bedeutung von hydrophoben Resten in der Umgebung der Cysteine für die Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen einem gebundenen Protein und Mia40.

3.3.6 Analyse der Umgebung der Cysteine in CX₉C-Substraten von Mia40

Mia40 bindet Substrate zunächst durch Interaktion hydrophober Oberflächen. Die hydrophobe Bindungsfurche von Mia40 befindet sich direkt neben dem aktiven Zentrum, weshalb die Reaktion mit Substratcysteinen mit einer unpolaren Umgebung bevorzugt ist. Dies führt zu einem 400-fachen Unterschied in der Rate der Reaktion mit dem schnellsten und dem langsamsten Cystein in Cox17*.

Die beiden Disulfide in Cox17 werden vermutlich durch zwei sequentielle Oxidationsreaktionen, katalysiert durch Mia40, gebildet. Würde sich zuerst das äußere Disulfid in Cox17* bilden, so würde dies zu einem teiloxidierten Intermediat führen, das bereits nativ-ähnliche Struktur hat und daher nur noch sehr geringe Bindungsaffinität zu Mia40 zeigt (Abbildung 8, Abbildung 10 d). Dies könnte einen effektiven zweiten Katalysezyklus verhindern. Aus diesem Grund wäre es für den Faltungsweg vorteilhaft zuerst das innere Disulfid zu bilden, da das dann resultierende Intermediat noch teilentfaltet ist (Abbildung 8) und die MISS/ITS-Sequenz, die die nicht kovalente Komplexbildung vermittelt, nach wie vor zugänglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass Cys36 besonders schnell mit Mia40 zum gemischten Disulfid reagiert. Die Auflösung dieses kovalenten Komplexes würde tatsächlich zunächst zur Bildung des inneren Disulfids führen.

Cox17 gehört zur Gruppe der CX₉C-Substrate von Mia40, die aus einer Helix-Schleife-Helix-Struktur bestehen, die durch zwei Disulfide zwischen den beiden Helices stabilisiert werden. Für alle Proteine dieser Gruppe besteht die Problematik beide Disulfide sequentiell durch Mia40 einzuführen. Auch für andere Substrate dieser Gruppe wäre es vorteilhaft das innere Disulfid zuerst zu oxidieren, was durch präferentielle Reaktion mit Cys2 oder 3 bedingt durch eine hydrophobe Umgebung erreicht werden kann. Um dies zu untersuchen, wurde in 12 weiteren mitochondrialen CX₉C-Proteinen die Hydrophobizität der drei Aminosäuren vor und nach einem Cystein mit Hilfe der Skala von Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1984) berechnet (Tabelle 4). Interessanterweise zeigt tatsächlich das jeweils zweite Cystein, das Cys36 in Cox17 entspricht, mit einem Wert von -0,16 im Mittel eine deutlich höhere Hydrophobizität, als die anderen Cysteine, die zwischen -0,28 und -0,31 liegen. Weiterhin ist in 6 von 13 Proteinen die Sequenz vor oder nach Cys2 und in zwei weiteren die Sequenz vor oder nach Cys3 die am stärksten hydrophobe. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Cysteine, die die innere Disulfidbrücke bilden, bevorzugt mit Mia40 reagieren.

Tabelle 3: Parameter von Assoziation und Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17

Mia40 +	Variante	Kinetik der Komplexbildung				Ausbildung des gem. Disulfids	
	#	K_D^{kin} (μM)	k_{on} ($\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	$k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ (μM)	k_{app} (s^{-1})	Amplitude
Cox17* _{26C}	8, 12	3,1 \pm 0,3	3,9 \pm 0,2	26,0 \pm 0,6	6,7	0,12 \pm 0,01	8,0 \pm 0,2
Cox17* _{26C} 29F30I33Y	26, 27	3,7 \pm 1.4	7,8 \pm 0,5	24,4 \pm 2,8	3,1	0,63 \pm 0,04	30 \pm 1
Cox17* _{26C} MISS swap	28, 30	0,40 \pm 0,04	6,4 \pm 0,1	9,3 \pm 0,3	1,5	55 \pm 9	34 \pm 3
Cox17* _{26C} 27I28L29F	32, 33	10 \pm 1	5,1 \pm 0,2	130 \pm 2	25	43 \pm 6	48 \pm 4
Cox17* _{36C}	9, 13	3,4 \pm 0,3	7,4 \pm 0,2	18,5 \pm 0,9	2.5	53 \pm 2	87 \pm 4
Cox17* _{36C} 37A38A39A	22, 23	18 \pm 3	4,3 \pm 0.2	110 \pm 2	26	0,17 \pm 0,01	75 \pm 4
Cox17* _{36C} 50A51A	18, 19	80 \pm 75 ¹⁾	0,38 \pm 0,06	11 \pm 1	29	23 \pm 3	28 \pm 1
Cox17* _{47C}	10, 14	1,36 \pm 0,07	15,6 \pm 0,3	25 \pm 1,7	1,6	4,3 \pm 0,8	68 \pm 1
Cox17* _{47C} 50A51A	17, 20	13 \pm 20	0,28 \pm 0,04	9 \pm 1	30	1,8 \pm 0,8	28 \pm 1
Cox17* _{57C}	11, 15	0,67 \pm 0,06	11,7 \pm 0,5	9,9 \pm 0,1	0,9	9,8 \pm 0,3	67 \pm 1
Cox17* _{57C} 37A38A39A	24, 25	1,4 \pm 0,1	10,8 \pm 0,5	50 \pm 2	4,6	23 \pm 3	63 \pm 3
Cox17* _{57C} 50A51A	18, 21	43 \pm 15 ¹⁾	0,4 \pm 0,04	18,6 \pm 0,4	47	2,1 \pm 0,9	67 \pm 1
Cox17* _{57C} MISS swap	29, 31	2,8 \pm 0,7	8,8 \pm 0,5	27 \pm 4	3,0	1,6 \pm 0.3	10 \pm 1

Die Nummerierung der Varianten entspricht Tabelle S 2. Die Bindungskinetiken wurden wie in Abbildung S 2 beschrieben mit den AEDANS-markierten Cox17*-Varianten und Mia40 verfolgt, die Ausbildung des gemischten Disulfids gemäß Abbildung 12 mit den unmarkierten Proteinen. Die K_D Werte wurden aus der Analyse der Bindungsamplituden erhalten, k_{on} and k_{off} aus der Steigung bzw. dem Schnittpunkt mit der y-Achse aus der Auftragung der Raten. Die apparenten Raten (k_{app}) und relativen Amplituden der Ausbildung des gemischten Disulfids entsprechen der Reaktion von Mia40 mit je 10 μM der Cox17*-Varianten. ¹⁾ Amplituden von Bindungsreaktionen mit geringer Affinität weisen einen sehr großen Fehler auf, da im zugänglichen Substratkonzentrationsbereich keine Sättigung erreicht wird.

Tabelle 4: Hydrophobizität der benachbarten Reste der Cysteine der CX₉C-Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum

Protein	Cystein 1				Cystein 2				Cystein 3				Cystein 4			
	vor		nach		vor		nach		vor		nach		vor		nach	
	AS	Hydroph.	AS	Hydroph.	AS	Hydroph.	AS	Hydroph.	AS	Hydroph.	AS	Hydroph.	AS	Hydroph.	AS	Hydroph.
Cox17	SSV	0,02	KPE	-1,79	RDT	-2,70	ILF	1,87	SEK	-2,00	KEF	-1,11	YKE	-1,70	MKG	-0,68
Mia40	HGP	-0,30	GEE	-1,08	AFS	0,60	FVY	1,17	GID	0,17	VEK	-1,20	MQD	-1,15	FRK	-2,29
Pet191	VAS	0,53	KDQ	-2,51	VAI	1,52	LQR	-2,00	PEL	-0,20	IAQ	0,29	FLD	0,42	KRG	-2,74
Cox19	DGE	-1,20	TKY	-1,26	YLK	-0,55	MQL	0,10	AMN	-0,10	RLL	-0,74	YLR	-1,25	RMD	-2,26
Mdm35	APE	-0,40	TDL	-0,37	YDS	-0,96	FNE	-0,65	ENE	-1,90	SKQ	-2,05	YTT	-0,34	VNA	0,15
Mic17	GRT	-1,80	EID	-0,61	FTR	-1,37	LDE	-0,81	FQI	0,65	DYY	-0,68	LKA	-0,32	QEA	-1,06
Mrp10	ANK	-1,50	LVL	1,60	LLQ	0,37	WSS	-0,15	SPK	-1,40	AGL	-0,69	LKS	-0,83	TSE	-1,06
Som1	QTN	-1,50	RLK	-2,37	QWE	-0,94	QFK	-1,18	EYV	-0,10	SPF	0,28	FEH	-0,41	IAP	0,91
Cox23	YDP	-0,80	EES	-1,50	SFQ	-0,34	LER	-1,89	RSK	-3,20	QEY	-1,29	YRE	-2,40	KKQ	-2,89
Cmc1	YKK	-2,20	ANF	0,22	MAD	-0,20	AKA	-0,90	FPT	0,36	DKQ	-2,50	MKS	-1,10	LLF	1,67
Cmc2	FHS	-0,10	LDF	0,42	LDK	-1,29	HQK	-2,19	FGL	1,30	NNE	-1,90	LNK	-1,21	LKE	-1,19
Cmc3	KTG	-1,10	YVE	-0,06	LQL	0,37	HAE	-0,77	WRQ	-2,10	FNE	-0,65	FRK	-2,29	WEK	-1,35
Emi1	TMS	-0,20	REA	-2,17	LTS	0,09	YSI	0,49	FTS	0,17	DKQ	-2,50	FKF	0,12	IIH	1,06
Summe	-11,0		-11,5		-5,41		-6,82		-8,3		-14,7		-12,5		-11,7	
Ø _{Rest}			-0,28				-0,16				-0,29				-0,31	

Für die Analyse wurden die Sequenzen der von Longen *et al.* (Longen *et al.*, 2009) beschriebenen CX₉C-Proteine aus *S. cerevisiae* verwendet. Angegeben sind die drei Aminosäuren (AS) vor bzw. nach einem Cystein, sowie deren unter Verwendung der Eisenberg Skala (Eisenberg *et al.*, 1984) berechneten Hydrophobizitäten (Hydroph.). Es sind zusätzlich die Summen über alle Proteine, sowie die durchschnittliche Hydrophobizität pro Rest (Ø_{Rest}) angegeben. Die Sequenz mit der größten Hydrophobizität innerhalb eines Proteins ist rot markiert.

3.4 Die konformationelle Faltung des Substrats ist die Triebkraft für die Oxidation durch Mia40

Die in dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Analysen der Interaktion von Mia40 und Cox17* zeigten, dass Mia40 hoch dynamische Komplexe mit dem reduzierten Substrat bildet. Anschließend folgt eine schnelle Ausbildung des kovalenten, gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17*, die durch die Wechselwirkung hydrophober Oberflächen gesteuert wird. Auf die Ausbildung des gemischten Disulfids folgt dessen Auflösung durch Angriff eines weiteren Cysteins des Substrats, woraufhin das Substrat in oxidiertem Zustand freigesetzt wird (Abbildung 6). Um diesen Prozess zu untersuchen, wurden Cox17*-Varianten verwendet, die beide Disulfide, oder mit Cox17*^{SSinnen} nur das innere Disulfid (Cys36, Cys47) bzw. mit Cox17*^{SSaußen} nur das äußere Disulfid (Cys26, Cys57) enthalten (Kapitel 3.1, Abbildung 7).

3.4.1 Ein Überschuss an Mia40 oxidiert Cox17 vollständig

Zunächst wurde der Verlauf der Oxidation von Cox17* mit beiden Disulfiden durch Mia40 untersucht. Es wurde ein 2,5-facher Überschuss an Mia40 gegenüber dem reduzierten Substrat gewählt, so dass die vollständige Oxidation beider Disulfide in Cox17* möglich ist. Beide Proteine wurden gemischt und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe der Alkylierungsmittel Iodacetat oder Iodacetamid gestoppt. Anschließend wurden die Proben durch nicht denaturierende Gelelektrophorese analysiert. Da hier die Auftrennung im Gegensatz zur SDS-PAGE nicht nur nach Größe, sondern auch nach Ladung erfolgt, können verschiedene Faltungs- und Oxidationszustände eines Proteins unterschieden werden, insbesondere wenn durch die Modifikation von Cysteinen durch Iodacetat zusätzliche negative Ladungen eingeführt werden. Auf diese Weise können reduziertes und oxidiertes Mia40, sowie Cox17* mit unterschiedlicher Anzahl an Disulfiden unterschieden werden (Abbildung S 11). Es wurde für die Analyse verschiedener Cox17*-Varianten jeweils das Alkylierungsmittel gewählt, das die beste Unterscheidung der oxidierten und reduzierten Spezies ermöglicht.

Es zeigte sich, dass gereinigtes Mia40 unter *in vitro* Bedingungen ohne zusätzliche Faktoren in der Lage ist reduziertes Cox17* zu oxidieren, wie bereits zuvor für Cox17 und weitere Substrate gefunden worden war (Banci *et al.*, 2009; Bien *et al.*, 2010; Bourens *et al.*). Die Interaktion zwischen Mia40 und reduziertem Cox17* erfolgt sehr schnell und es kann bereits nach 5 s kein reduziertes Substrat mehr detektiert werden (Abbildung 21 a). Dies stimmt mit den Ergebnissen der kinetischen Analyse der Ausbildung des gemischten Disulfids überein. Hier wurde gezeigt, dass die Reaktion aller Cysteine in Cox17* mit Mia40, mit Ausnahme von Cys26, mit apparenten Raten zwischen 4 s^{-1} und 53 s^{-1} in der Totzeit der manuellen Mischung abläuft (Abbildung 12). Dies legt nahe, dass in reduziertem Cox17* Cys26 nicht an der initialen, kovalenten Komplexbildung mit Mia40 beteiligt ist.

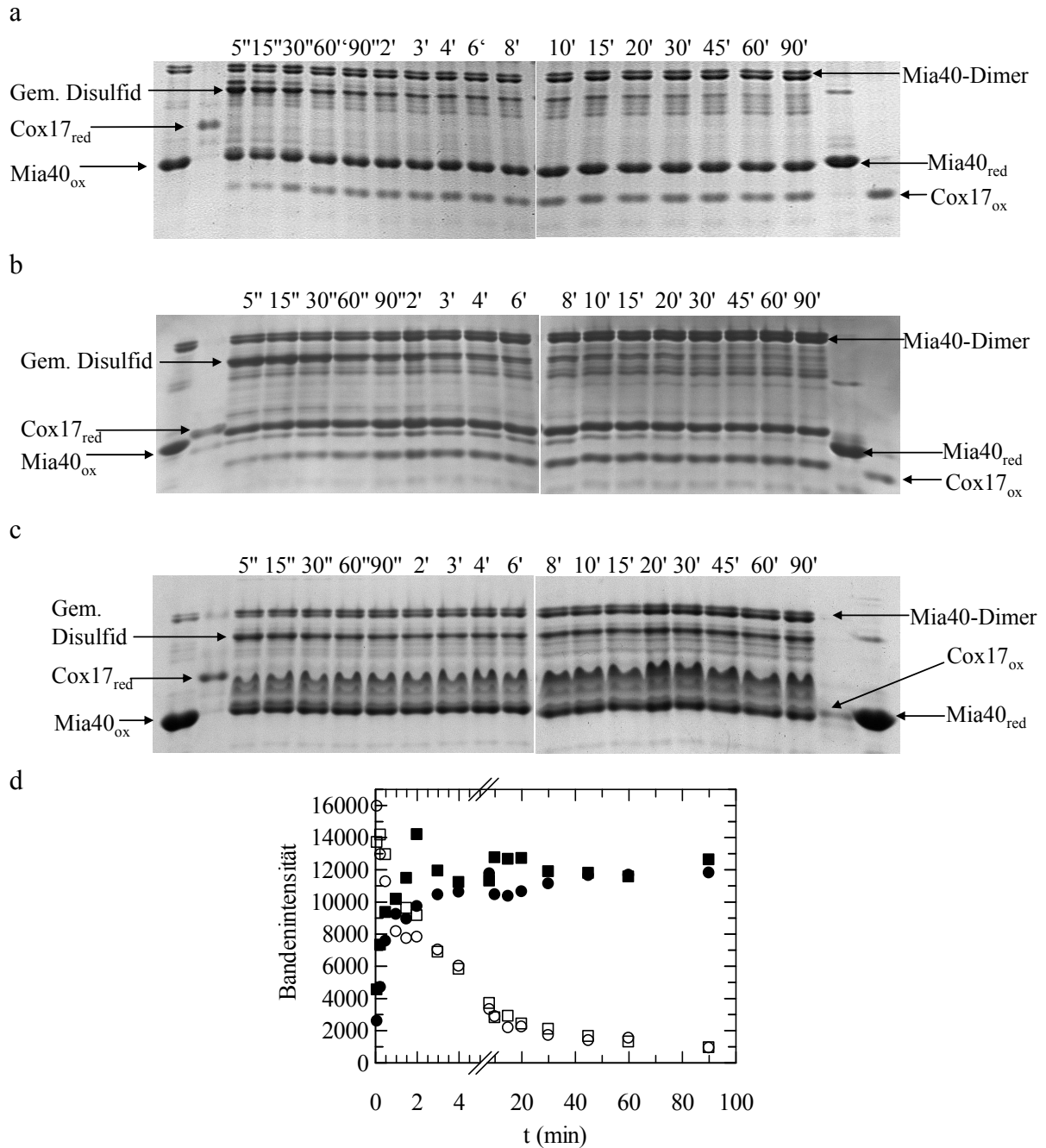


Abbildung 21: Oxidation von Cox17*-Varianten durch Mia40. Es wurden je 20 μM reduziertes (a) Cox17*, (b) Cox17*^{SSaußen} und (c) Cox17*^{SSinnen} mit 50 μM Mia40 bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetamid (a,c) bzw. Iodacetat (b) blockiert und die Proben durch native PAGE analysiert. (d) Die Bandenintensitäten der oxidierten Formen von Cox17* (●) und Cox17*^{SSaußen} (■), sowie der gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17* (○) bzw. Cox17*^{SSaußen} (□) aus den Teilabbildungen a und b wurden mit dem Programm ImageJ bestimmt und gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

Um die Kinetik der Oxidation besser analysieren zu können, wurden die Bandenintensitäten densitometrisch ausgewertet. Es muss jedoch beachtet werden, dass die verschiedenen Proteine unterschiedliche Färbereigenschaften besitzen und auch innerhalb einer Spezies die Färbung nicht linear mit der Konzentration korreliert sein muss und daher Quantifizierungen

nicht eindeutig möglich sind. Schon nach 5 s konnte oxidiertes Cox17* nachgewiesen werden. Die Auftragung der Bandenintensität von oxidiertem Cox17* zeigte, dass bereits nach ca. 2 min der Großteil des Substrats durch Mia40 oxidiert wurde und die weitere Zunahme nur langsam erfolgt (Abbildung 21 d).

Neben den Ausgangs- und Endprodukten der Reaktion konnte auch das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17* als Reaktionsintermediat auf dem Gel detektiert werden. Um den kovalenten Komplex zu identifizieren wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend durch SDS-PAGE analysiert. Hierdurch wurde gezeigt, dass diese Spezies durch Reduktionsmittel in die Komponenten Cox17* und Mia40 gespalten wird und es sich tatsächlich um eine kovalente Bindung zwischen Mia40 und Cox17* handelt (Abbildung S 12). Das gemischte Disulfid ist bereits in der ersten Probe nach 5 s deutlich zu erkennen. Im Verlauf der Reaktion nimmt die Bandenintensität ab, jedoch langsamer, als die Zunahme der Bande von oxidiertem Cox17* (Abbildung 21 d). Eine Erklärung hierfür wäre, dass durch die schlechten Färbeeigenschaften von Cox17* geringe Änderungen in der Zunahme der oxidierten Spezies nicht aufgelöst werden.

Werden beide Disulfide in einer sequentiellen Reaktion mit Mia40 in das Substrat eingeführt, so müsste als Reaktionsintermediat teiloxidiertes Cox17* mit einem Disulfid frei werden. Eine solche Spezies konnte auf dem Gel nicht detektiert werden, was jedoch auch daran liegen kann, dass die Weiterreaktion dieses Proteins mit Mia40, oder O₂ so schnell ist, dass es in diesen Experimenten nicht isoliert werden kann.

Oberhalb der Bande des gemischten Disulfids ist eine zweite, deutlich schwächere Bande zu erkennen, die bereits nach ca. 1 min verschwunden ist. Diese Bande konnte nicht zugeordnet werden, das Laufverhalten deutet jedoch darauf hin, dass es sich ebenfalls um ein gemischtes Disulfid handelt, das beispielsweise über ein alternatives Cystein des Substrats gebildet wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich hierbei um das initiale Intermediat mit dem reduzierten Substrat handelt, während die untere Bande das zweite gemischte Disulfid mit dem teiloxidierten Cox17 darstellt, das zum volloxydierten Protein führt.

Werden die Proben nicht durch Iodacetamid, sondern durch Iodacetat modifiziert, können wegen der zusätzlich eingeführten negativen Ladungen auch oxidiertes und reduziertes Mia40 unterschieden werden (Abbildung S 13 a). Durch die Oxidation von Cox17* wird reduziertes Mia40 freigesetzt, dessen Bande über ca. 5 min konstant ist und dann abnimmt, wobei parallel die Bande von oxidiertem Mia40 zunimmt. Vermutlich wird das katalytische Disulfid von Mia40 in diesem Zeitbereich durch Reaktion mit Sauerstoff reoxidiert.

Um zu bestimmen in welcher Reihenfolge die beiden Disulfide durch Mia40 eingeführt werden, wurde auch die Oxidation der Eindisulfidvarianten untersucht. Reduziertes Cox17_{SSaußen} reagiert ebenfalls vollständig innerhalb von 5 s mit Mia40 unter Ausbildung des gemischten Disulfids (Abbildung 21 b). Dies deutet an, dass die Reaktion mit Cys57 aus dem Substrat stattfindet, da Cys26 mit einer apparenten Rate von 0,12 s⁻¹ so langsam reagiert, dass der Zeitverlauf auf dem Gel sichtbar sein sollte (Abbildung 12). Das gemischte Disulfid wird

dann unter Freisetzung des oxidierten Substrats aufgelöst. Der Zeitverlauf, der densitometrisch für die Zunahme des oxidierten Substrats und die Abnahme des gemischten Disulfids ermittelt wurde, ist annähernd gleich wie für Cox17* (Abbildung 21 d). Dies deutet darauf hin, dass die Bildung der äußeren Disulfidbrücke geschwindigkeitsbestimmend ist und sich demnach das innere Disulfid sehr schnell bildet.

Auch reduziertes Cox17*_{SSinnen} bildet das gemischte Disulfid mit Mia40 extrem schnell (Abbildung 21 c). Im Gegensatz zu Cox17* und Cox17*_{SSaußen} bleibt das gemischte Disulfid zwischen Cox17*_{SSinnen} und Mia40 über den gesamten Zeitbereich des Experiments konstant. Ob oxidiertes Cox17*_{SSinnen} frei wird ist nicht mit Sicherheit zu sagen, da die Banden des oxidierten Substrats und Mia40 ein annähernd gleiches Laufverhalten zeigen. Die Analyse der Reaktion unter Verwendung von Iodacetat als Alkylierungsmittel zeigt jedoch, dass reduziertes Mia40 frei wird, so dass eine Oxidationsreaktion stattgefunden haben muss (Abbildung S 13 b). Zusätzlich bildet sich eine diffus laufende Bande, die keiner der Referenzbanden entspricht und in den Experimenten mit Cox17* und Cox17*_{SSaußen} nicht sichtbar war. Das Laufverhalten dieser Bande ändert sich nicht, wenn statt Iodacetat Iodacetamid als Abstoppreagens verwendet wird, was dafür spricht, dass diese Spezies keine freien Cysteine aufweist. Diese Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und durch SDS-PAGE analysiert. Auch auf dem SDS-Gel bildete sich eine sehr diffuse Bande, deren Laufweite eher der von Mia40, als der von Cox17*_{SSinnen} entspricht. Eine sichere Zuordnung dieser Bande war jedoch nicht möglich (Abbildung S 14).

Zusammenfassend zeigen die Experimente zur Oxidation der Cox17*-Varianten mit unterschiedlicher Disulfidverbrückung durch Mia40, dass sich in allen Fällen die gemischten Disulfide zwischen Enzym und Substrat extrem schnell ausbilden und nur langsam wieder aufgelöst werden. Für Cox17*_{SSinnen} bleibt das kovalente Intermediat sogar über den gesamten Zeitbereich von 90 min nachweisbar. Die oxidierten Formen von Cox17* und Cox17*_{SSaußen} bilden sich ähnlich schnell, was auf einen gemeinsamen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt hindeutet. Cox17*_{SSinnen} kann von Mia40 nicht ohne weiteres oxidiert werden und ein Großteil des Substrats bleibt kovalent an Mia40 gebunden. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen kann es sein, dass das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17*_{SSinnen} nicht aufgelöst werden kann. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, da diese Reaktion auch während der Oxidation von Cox17* ablaufen muss. Weiterhin ist das Substratcystein 47, das am gemischten Disulfid zwischen Mia40 und Cys36 aus Cox17* angreift, nur wenige Reste entfernt was die Reaktion erleichtern sollte. Eine plausiblere Erklärung ist, dass zwar oxidiertes Cox17*_{SSinnen} gebildet wird, dieses jedoch von Mia40 als nicht nativ gefaltet erkannt und daher wieder angegriffen wird. Dies würde implizieren, dass Mia40 eine Korrekturlesefunktion besitzt, über die nicht nativ gefaltete Proteine erkannt werden.

3.4.2 Mia40 differenziert zwischen vollständig und teilweise oxidierten Substraten

Da eine Korrekturlesefunktion von Mia40 bisher nicht bekannt ist, wurde untersucht, ob Cox17*_{SSinnen} nicht aus dem gemischten Disulfid mit Mia40 freigesetzt werden kann, oder ob gebildetes oxidiertes Cox17*_{SSinnen} wieder mit Mia40 reagiert. Eine solche Reaktion würde durch den Angriff eines Cysteins des reduzierten katalytischen Disulfids von Mia40 am Disulfid des Substrats erfolgen. Daher wurde analysiert, ob die oxidierten Cox17*-Varianten in Anwesenheit von reduziertem Mia40 stabil sind. Es wurden je 20 µM reduziertes Mia40 und Cox17* inkubiert, die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Iodacetamid abgestoppt und die Proben durch native PAGE analysiert. Es zeigte sich, dass reduziertes Mia40 nicht mit vollständig oxidiertem Cox17* reagiert (Abbildung 22 a). Der Grund hierfür ist, dass das Substrat stabil gefaltet vorliegt. Dies führt zu dem, dass keine hydrophoben Oberflächen exponiert sind, die an die hydrophobe Furche von Mia40 binden können (Abbildung 8, Abbildung 10). Zum anderen sind die nativen Disulfide im Inneren des Proteins verborgen und mit einem Reduktionspotential von -340 mV sehr stabil (Voronova *et al.*, 2007).

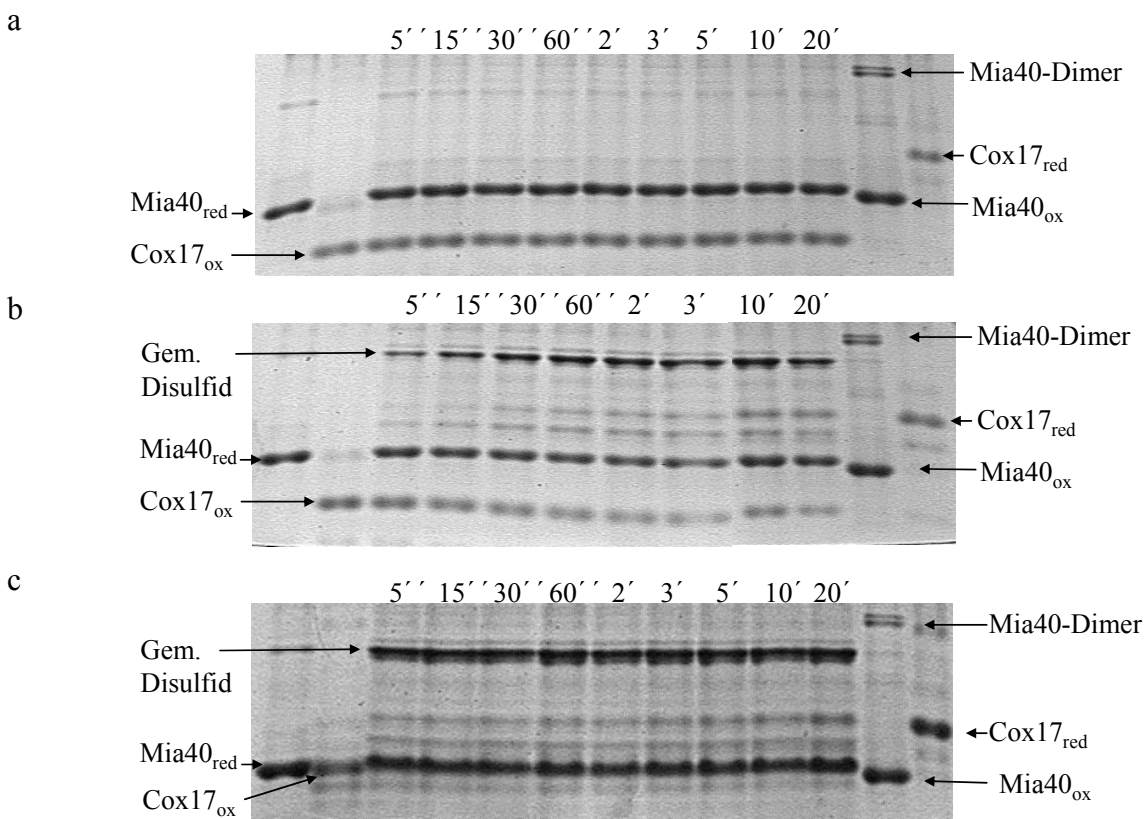


Abbildung 22: Reaktion von reduziertem Mia40 mit Cox17*-Varianten. Es wurden 20 µM reduziertes Mia40 mit 20 µM oxidiertem Cox17* (a), Cox17*_{SSaußen} (b) und Cox17*_{SSinnen} (c) bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetamid blockiert und die Proben durch native PAGE analysiert.

Während also volloxydiertes Cox17* gegenüber der Reduktion durch reduziertes Mia40 inert ist, bilden beide Eindisulfidvarianten von Cox17* gemischte Disulfide mit reduziertem Mia40 aus (Abbildung 22 b,c). Die Intensität der Bande des gemischten Disulfids mit Cox17*^{SSinnen} ist deutlich höher, als die von Cox17*^{SSaußen}. Dies liegt vermutlich daran, dass oxidiertes Cox17*^{SSaußen} nativ ähnlich gefaltet ist, während Cox17*^{SSinnen} nur teilgefaltet vorliegt und damit das Disulfid durch die Proteinstruktur kaum stabilisiert werden kann (Abbildung 8). Bindungsstudien hatten zuvor gezeigt, dass oxidiertes Cox17*^{SSinnen} noch mit guter Affinität an Mia40 bindet (Abbildung 10 d), was die Bildung des gemischten Disulfids durch Angriff eines Cysteins aus Mia40 an der Disulfidbrücke des Substrats erleichtert.

Dieses Experiment liefert Hinweise darauf, dass die langlebigen gemischten Disulfide bei der Oxidation der Cox17*-Varianten nicht allein durch die langsame Auflösung durch ein Substratcystein zustande kommen könnten. Sie können auch ein Zeichen dafür sein, dass während der Katalyse teil-, oder fehlgefaltete Cox17*-Spezies entstehen, die von reduziertem Mia40 als nicht korrekt gefaltet erkannt und daher wieder angegriffen werden. Reduziertes Mia40 bildet nicht nur gemischte Disulfide mit teiloxydierten Substraten, sondern kann auch die reduzierten Formen von Cox17*^{SSaußen} und Cox17*^{SSinnen} freisetzen. Dies zeigt, dass Mia40 als Reduktase wirken kann, was eine Grundbedingung für Disulfidisomeraseaktivität ist.

Teiloxydierte Substrate sind in Anwesenheit von reduziertem Mia40 nicht stabil und werden kovalent gebunden. Dieser Prozess beeinflusst die in Abbildung 21b und c gezeigten Reaktionskinetiken und führt dazu, dass Cox17*^{SSinnen} nicht effizient oxidiert wird. Um die Oxidation der Eindisulfidvarianten von Cox17* durch Mia40 ohne weitere Einflüsse beobachten zu können, wurde sie in Anwesenheit der Sulfhydryloxidase Erv1 untersucht. Erv1 ist ein FAD-haltiges Enzym, das im mitochondrialen Intermembranraum reduziertes Mia40 reoxidiert. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist ausreichend oxidiertes Mia40 vorhanden um Cox17* vollständig zu oxidieren, so dass die Regeneration durch Erv1 für die Katalyse nicht notwendig ist. Jedoch wird durch Erv1 das entstehende reduzierte Mia40 nach der Reaktion mit Cox17* effizient reoxidiert, so dass der Angriff an den oxidierten Eindisulfid-Cox17*-Varianten verhindert wird.

Die Oxidation von Cox17* durch Mia40 wird durch die Anwesenheit von Erv1 nicht beeinflusst (Abbildung S 15), da vollständig oxidiertes Cox17* stabil gefaltet ist und ohnehin nicht mehr mit reduziertem Mia40 reagiert. Im Gegensatz hierzu zeigen sich deutliche Unterschiede für die Oxidation der Variante mit der äußeren Disulfidbrücke. Hier löst sich das gemischte Disulfid in Anwesenheit von Erv1 (Abbildung 23 a) unter Bildung von oxidiertem Cox17*^{SSaußen} schneller auf, als ohne die Sulfhydryloxidase (Abbildung 23 b). Dies bedeutet, dass die langlebigen gemischten Disulfide in Abwesenheit von Erv1 durch Reaktion von reduziertem Mia40 mit oxidiertem Cox17*^{SSaußen} entstehen und die reine Oxidationsreaktion schneller ist, als auf dem Gel sichtbar. Es zeigt weiterhin, dass das gemischte Disulfid nicht über 90 min erhalten bleibt, sondern sich ein dynamisches

Gleichgewicht zwischen gemischtem Disulfid und oxidiertem Cox17 bzw. reduziertem Mia40 einstellt. Für Cox17*_{SSinnen} konnte kein Einfluss von Erv1 auf den Verlauf der Oxidation detektiert werden. Die Bande des gemischten Disulfids ist nach wie vor stark ausgeprägt und über 90 min stabil. Auch die zusätzliche diffuse Bande tritt wieder auf. Möglicherweise ist die Interaktion zwischen reduziertem Mia40 und Cox17*_{SSinnen} schneller, als die Reoxidation von reduziertem Mia40 durch Erv1, so dass ein Angriff am oxidierten Substrat nicht unterdrückt werden konnte.

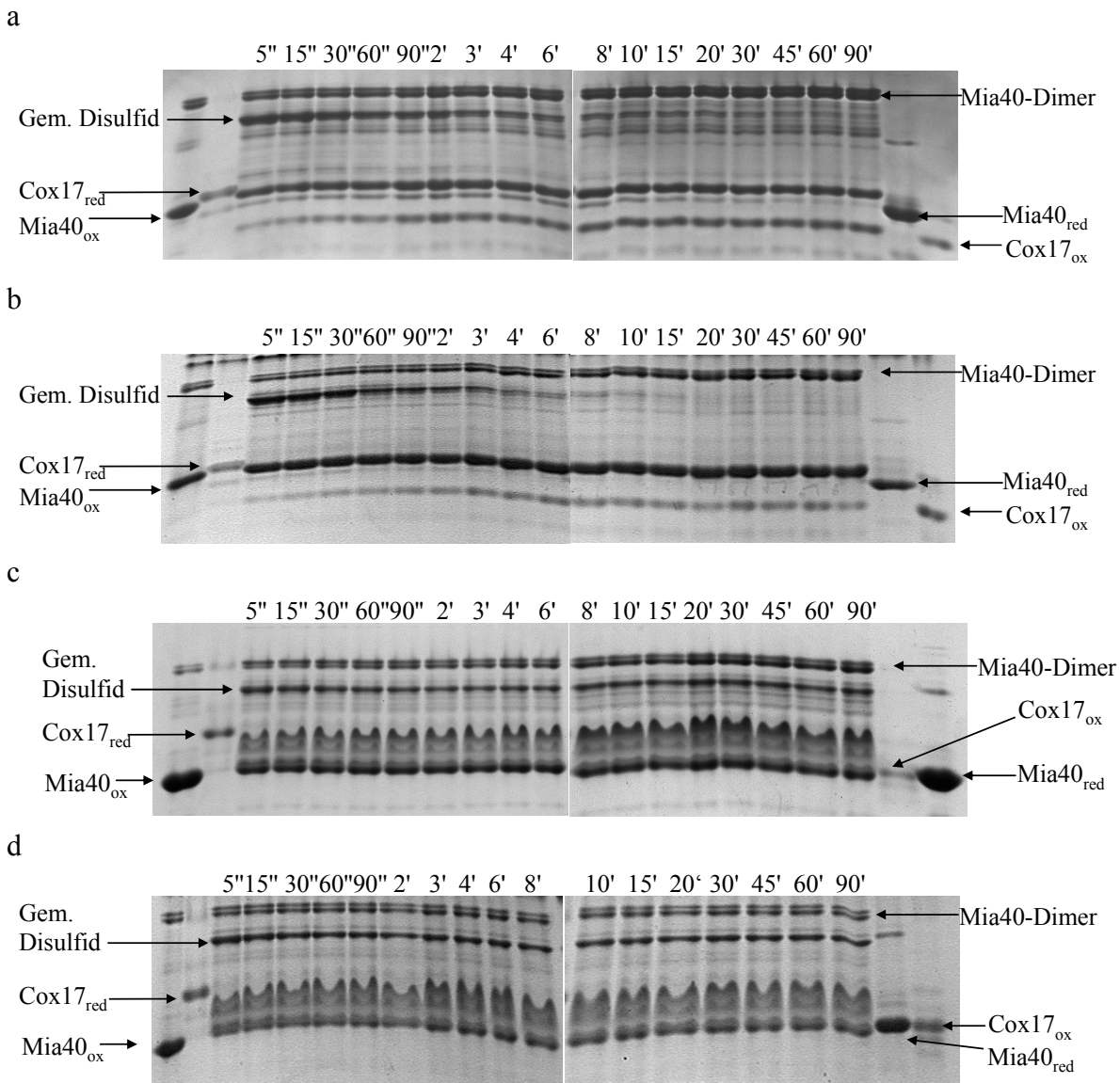


Abbildung 23: Oxidation von Cox17*-Varianten durch Mia40 in Gegenwart von Erv1. Es wurden je 50 µM Mia40 mit (a) 20 µM reduziertem Cox17*_{SSäußen}, (b) 20 µM reduziertem Cox17*_{SSäußen} und 1 µM Erv1, (c) Cox17*_{SSinnen} und (d) 20 µM reduziertem Cox17*_{SSinnen} und 1 µM Erv1 bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetamid blockiert und die Proben durch native PAGE analysiert. Teilabbildungen (a) und (c) entsprechen Abbildung 21 (b) und (c).

3.4.3 Katalytische Mengen Mia40 oxidieren Cox17 in Anwesenheit von Erv1

Unter den bisher gewählten experimentellen Bedingungen lag Mia40 in großem Überschuss gegenüber dem Substrat und Erv1 vor, so dass reduziertes Mia40 vermutlich nicht schnell genug reoxidiert wurde um eine Reaktion mit den teiloxidierten Cox17*-Varianten komplett zu verhindern. Daher wurde in weiteren Experimenten Mia40 gegenüber Cox17* im Unterschuss eingesetzt. Die geringeren Konzentrationen führen dazu, dass weniger reduziertes Mia40 entsteht, das wiederum schneller durch Erv1 reoxidiert werden kann. Hinzu kommt, dass die Regeneration durch Erv1 nun essentiell ist, um ausreichend aktives Mia40 für die vollständige Oxidation von Cox17* zu generieren.

Cox17* und Cox17*_{SSaußen} werden durch katalytische Mengen Mia40 in Anwesenheit von Erv1 vollständig oxidiert (Abbildung 24 a,b). Das gemischte Disulfid bildet sich wiederum sehr schnell und die Bandenintensität bleibt bis ca. 14 min konstant (Abbildung S 16 a,b). Ebenfalls bis ca. 14 min kann reduziertes Cox17* nachgewiesen werden, das mit Mia40 erneut gemischte Disulfide bildet, sobald das reduzierte Mia40 durch Erv1 reoxidiert wurde. Somit wird laufend neues kovalentes Intermediat produziert. Ist das gesamte reduzierte Substrat verbraucht, nimmt auch die Bandenintensität des gemischten Disulfids ab. Die Freisetzung der oxidierten Substrate aus dem kovalenten Komplex mit Mia40 ist für Cox17* und Cox17*_{SSaußen} annähernd gleich schnell (Abbildung 24 d).

Unter den gewählten katalytischen Bedingungen konnte erstmals die Oxidation von Cox17*_{SSinnen} beobachtet werden (Abbildung 24 c, d). Obwohl oxidiertes Cox17*_{SSinnen} auf der gleichen Höhe läuft wie Mia40, kann hier die Aussage getroffen werden, dass eine Oxidation stattgefunden hat, da die vorliegende Bande eine zu starke Intensität aufweist um allein auf 5 μ M Mia40 zurückzuführen zu sein. Dies zeigt, dass die Oxidation von Cox17*_{SSinnen} per se möglich ist und in den vorherigen Experimenten unter stöchiometrischen Bedingungen reduziertes Mia40 das bereits gebildete Disulfid im Substrat wieder auflöste. Das gemischte Disulfid zwischen Cox17*_{SSinnen} und Mia40 zeigt ebenfalls zu Beginn der Reaktion eine konstante Intensität, so lange es durch reduziertes Substrat immer wieder neu gebildet werden kann (Abbildung S 16 c). Ab ca. 20 min nimmt die Bandenintensität ab, allerdings wird die Bande nicht vollständig aufgelöst wie für Cox17* und Cox17*_{SSaußen} beobachtet worden war. Dies liegt vermutlich daran, dass reduziertes Mia40 durch Erv1 nicht schnell genug reoxidiert wird, um den Angriff an oxidiertem Cox17*_{SSinnen} komplett zu verhindern. Auch die diffus laufende Bande, die bereits während der Katalyse durch stöchiometrische Mia40-Konzentrationen beobachtet wurde, trat wieder auf. Sie ist erstmals ab 10 min sichtbar, nimmt bis ca. 20 min an Intensität zu und bleibt dann konstant (Abbildung S 16 c).

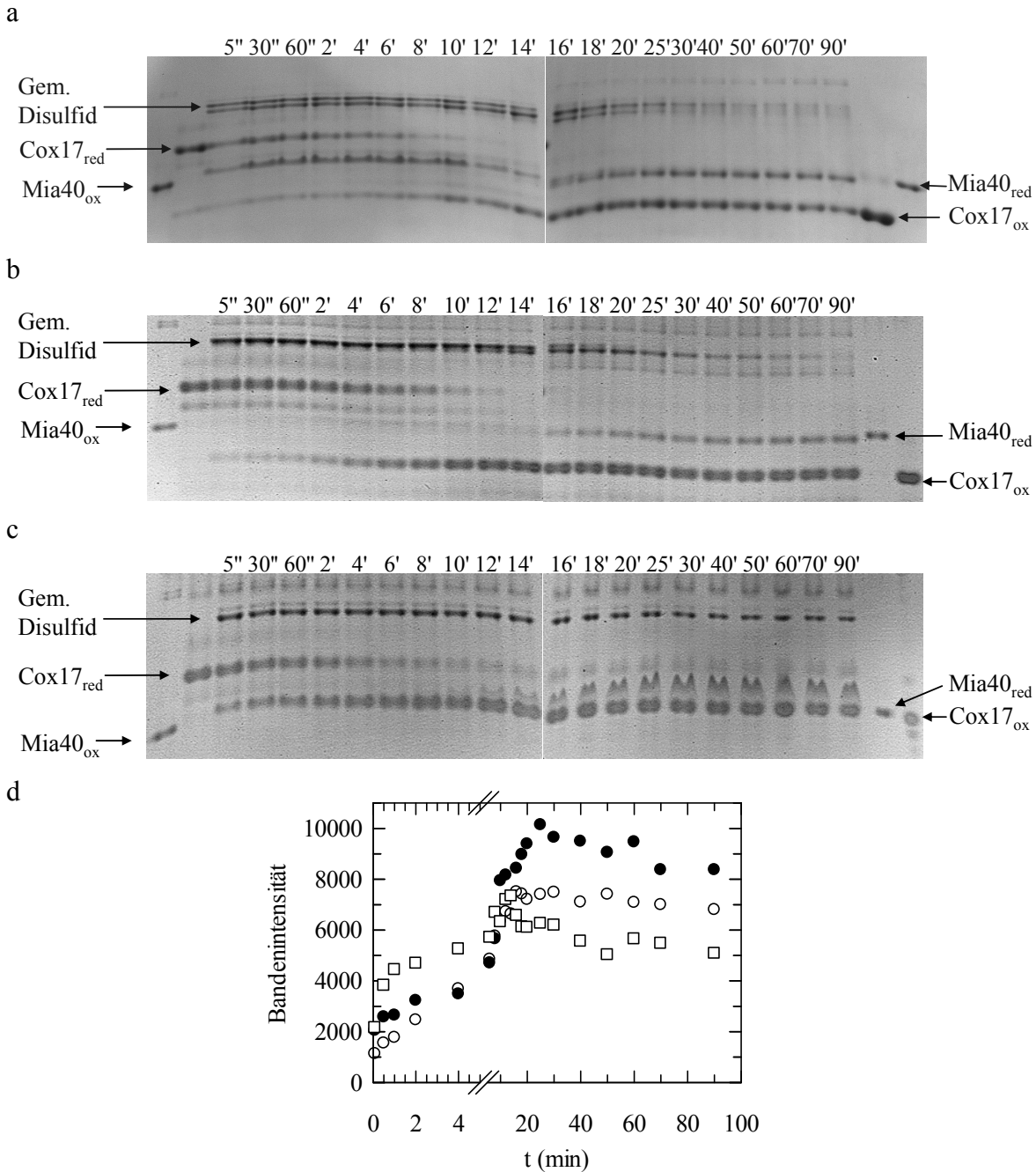


Abbildung 24: Oxidation von Cox17*-Varianten durch Mia40 und Erv1. Es wurden 20 μM reduziertes (a) Cox17*, (b) Cox17*^{SSaußen} und (c) Cox17*^{SSinnen} mit 5 μM Mia40 und 1 μM Erv1 bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetamid blockiert und die Proben durch native PAGE analysiert. (d) Die Bandenintensitäten der oxidierten Formen von Cox17* (●), Cox17*^{SSaußen} (○) und Cox17*^{SSinnen} (□) aus den Teilabbildungen a bis c wurden mit dem Programm ImageJ bestimmt und aufgetragen. Die Intensitäten der anderen Banden sind in Abbildung S 16 gezeigt.

Die Oxidation von reduziertem Cox17* und Cox17*^{SSaußen} durch stöchiometrische Mengen Mia40 hatte bereits darauf hingedeutet, dass beide Reaktionen einen gemeinsamen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt haben (Abbildung 21 d). Auch bei der Oxidation dieser Proteine im katalytischen Regime nimmt die Bandenintensität der beiden oxidierten Spezies annähernd gleich schnell zu, was die anfängliche Beobachtung bestätigt (Abbildung

24 d). Demnach ist die Bildung des äußeren Disulfids eher langsam, was daran liegen kann, dass die Cysteine 26 und 57, die oxidiert werden müssen, in der Proteinkette weit voneinander entfernt sind. Die Oxidation des inneren Disulfids spielt für den Zeitverlauf der Oxidation von Cox17* keine Rolle und muss daher schnell sein. Tatsächlich zeigt die densitometrische Auswertung der Oxidation von Cox17*_{SSinnen} eine deutlich schnellere Freisetzung des oxidierten Substrats, als für die beiden anderen Cox17*-Varianten. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass Mia40 die beiden Disulfide in Cox17* sequentiell einführt, wobei zuerst das innere Disulfid und dann das äußere Disulfid gebildet wird. Die Reihenfolge wird zum einen durch die sehr schnelle Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cys36 aus Cox17* gesteuert und zum anderen durch die schnelle Freisetzung des Substrats mit dem inneren Disulfid, da die lokale Konzentration der Cysteine 36 und 47 des Substrats wegen der Nähe in der Aminosäuresequenz groß ist.

3.4.4 Mia40 ist eine Disulfidisomerase

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Mia40 reduziertes Cox17* *in vitro* im katalytischen und stöchiometrischen Regime korrekt oxidieren kann. Auch die Eindisulfidvarianten von Cox17* werden oxidiert, jedoch nach der Katalyse als nicht nativ gefaltet erkannt und von reduziertem Mia40 wieder unter Bildung des gemischten Disulfids angegriffen. Aus diesem gemischten Disulfid wird zum Teil reduziertes Substrat freigesetzt (Abbildung 22 b, c). Demnach hat Mia40 zumindest eine rudimentäre Korrekturlese-Funktion, die anhand des Faltungszustands des Substrats den korrekten Oxidationszustand erkennen kann.

Es stellte sich nun die Frage, ob Mia40 eine reine Thioloxidase ist, wie beispielsweise DsbA, oder wie PDI auch Disulfidisomerasefunktion besitzt, d.h. ob nicht native Disulfide in korrekte Verbrückungen umgewandelt werden können. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, ob Mia40 nicht native Disulfide in Cox17* einführen kann, oder ob spezifisch die nativen Disulfide gebildet werden, beispielsweise vorgegeben durch eine frühe Helixbildung im reduzierten Substrat.

Cox17* enthält vier Cysteine, die drei verschiedene vollständig oxidierte Spezies bilden können. Die Strukturen von nativem und den beiden nicht nativen oxidierten Proteine sind schematisch in Abbildung 25 gezeigt.

Um zu untersuchen, ob Mia40 nicht korrekte Disulfide bilden kann wurden Cox17*-Varianten hergestellt, die zwei Cysteine besitzen, die im nativen Protein nicht verknüpft sind. Eine Variante enthält mit Cys26 und Cys36 Reste, die in derselben Helix liegen (Cox17*_{26C36C}), in der anderen Variante liegen die Cysteine 36 und 57 (Cox17*_{36C57C}) in der Peptidkette weiter voneinander entfernt. Die CD-Spektren der beiden Proteine zeigen, dass diese auch in der oxidierten Form entfaltet vorliegen (Abbildung S 17).

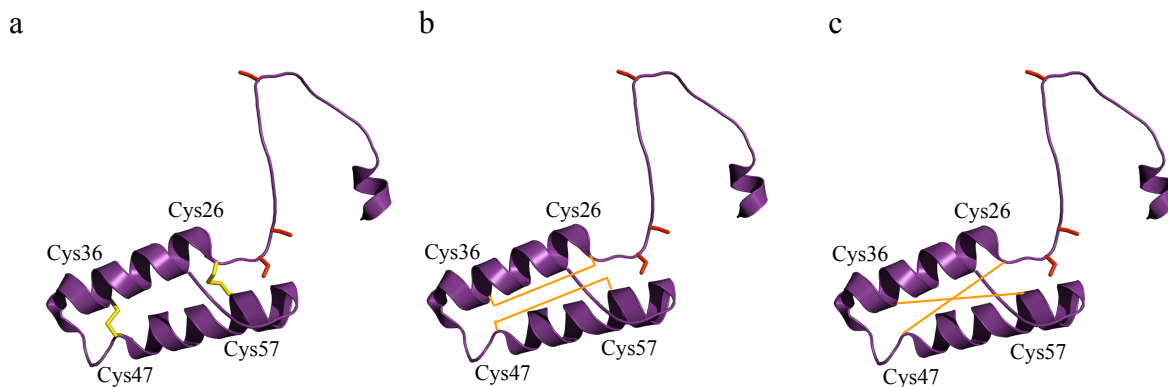


Abbildung 25: Mögliche Disulfidverbrückungen in Cox17*. Gezeigt ist die Struktur von Cox17* aus *S. cerevisiae* mit (a) den nativen Disulfiden und (b, c) den beiden möglichen Kombinationen von nicht nativen Disulfiden, dargestellt als gelbe Linien. Die Cysteine sind gemäß der Aminosäuresequenz nummeriert. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol und dem pdb-Eintrag 1U97 erstellt.

Beide reduzierten Cox17*-Varianten bilden, wie schon für andere Cox17*-Varianten beobachtet, extrem schnell das kovalente Intermediat mit Mia40 aus (Abbildung 26). Auffallend bei der Betrachtung der Banden des gemischten Disulfids ist, dass sich für Cox17*_{26C36C} nur ein kovalentes Intermediat bildet (Abbildung 26 a), während im Fall von Cox17*_{36C57C} zwei Banden sichtbar sind (Abbildung 26 b). Aus der Analyse der Kinetik der Ausbildung des gemischten Disulfids für die einzelnen Cysteine ist bekannt, dass Cys26 extrem unreaktiv ist und daher vermutlich keinen Anteil am kovalenten Intermediat besitzt. Daher bildet sich für die Variante Cox17*_{26C36C} nur ein kovalenter Komplex über Cys36. Cys57 reagiert mit einer apparenten Rate von ca. 10 s^{-1} zwar deutlich langsamer als Cys36 mit ca. 55 s^{-1} (Tabelle 3), ist jedoch nicht so stark beeinträchtigt, dass eine Reaktion mit Mia40 unter den gewählten Bedingungen nicht auftritt. Daher könnten die beiden Banden, die für Cox17*_{36C57C} sichtbar sind auf die Bildung eines Komplexes mit Cys36 und Cys57 zurückzuführen sein, wobei die stärkere, obere Bande vermutlich dem gemischten Disulfid mit Cys36 entspricht.

Aus dem gemischten Disulfid zwischen Mia40 und Cox17*_{26C36C} wird oxidiertes Cox17*_{26C36C} mit der nicht nativen Disulfidbrücke freigesetzt (Abbildung 26 a), die Oxidation ist jedoch nicht vollständig und das gemischte Disulfid bleibt über den gesamten Zeitraum des Experiments erhalten. Dies liegt vermutlich daran, dass oxidiertes Cox17*_{26C36C} entfaltet ist und daher, genau wie Cox17*_{SSinnen}, weiterhin mit reduziertem Mia40 zurück zum gemischten Disulfid reagiert. Für Cox17*_{36C57C} wurde keine Oxidation beobachtet (Abbildung 26 b).

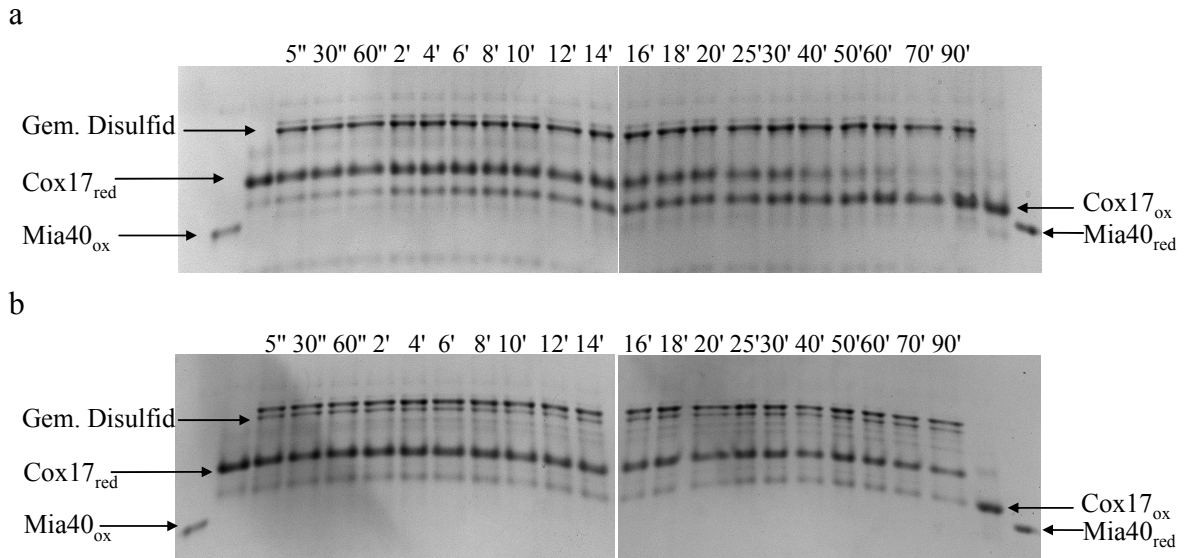


Abbildung 26: Oxidation von Cox17*-Varianten durch Mia40 und Erv1. Es wurden 20 μM reduziertes (a) Cox17*_{26C36C} und (b) Cox17*_{36C57C} mit 5 μM Mia40 und 1 μM Erv1 bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetamid blockiert und die Proben durch native PAGE analysiert.

Die Analyse der Oxidation von Cox17*-Varianten, die je zwei Cysteine enthalten, die im nativen Protein nicht verknüpft sind ergab, dass Mia40 falsche Disulfide in Cox17* einführen kann. Allerdings ist dieser Prozess limitiert. So können die beiden sequentiellen Cysteine an Position 26 und 36 mit guter Effizienz oxidiert werden. Die weit voneinander entfernt liegenden Cysteine 36 und 57 werden dagegen nicht verknüpft, möglicherweise weil die Auflösung des gemischten Disulfids durch Angriff des zweiten Substratcysteins wegen der großen Entfernung der Reste voneinander erschwert ist.

Da Mia40 während der Katalyse also auch nicht native Disulfide bilden kann, stellte sich die Frage ob Mia40 auch Disulfidisomerasefunktion besitzt, um diese nicht nativen Verbrückungen auflösen und erneut oxidieren zu können. Um dies zu untersuchen musste zunächst fehlverbrücktes Cox17* (*scrambled* Cox17*, scCox17*) hergestellt werden. Dies ist möglich, indem reduziertes Cox17* in Anwesenheit des Denaturierungsmittels GdmCl durch Glutathion oxidiert wird. Da das Protein in entfaltetem Zustand gehalten wird kann die Sekundärstruktur die oxidative Faltung nicht steuern und es bilden sich zufällig Disulfide aus, präferentiell zwischen benachbarten Cysteinen.

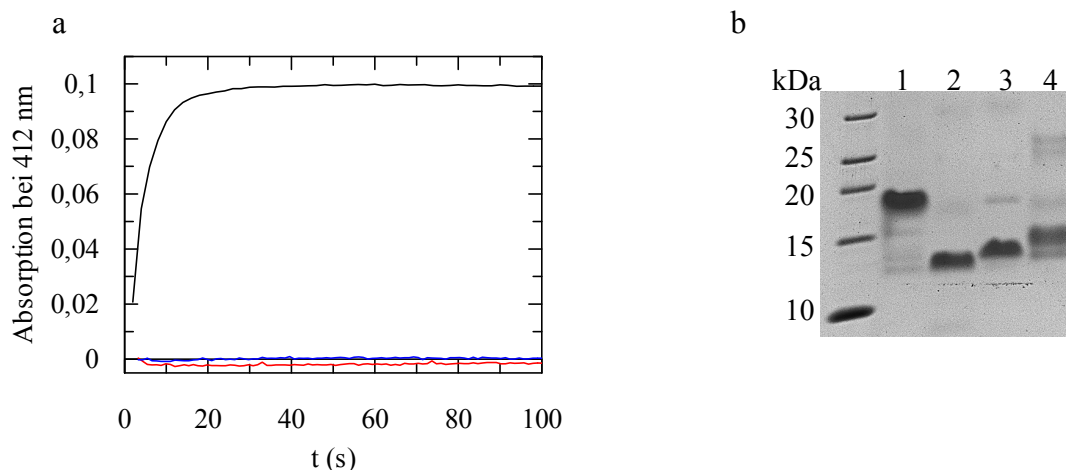


Abbildung 27: Charakterisierung von fehlverbrücktem Cox17*. (a) Es wurde die Reaktion von je 5 μ M Cox17*_{36C} (—), bzw. nativem (---) und fehlverbrücktem (---) Cox17* mit 50 μ M DTNB anhand der Absorptionsänderung bei 412 nm in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C verfolgt. (b) Die verschiedenen Cox17-Spezies lassen sich durch nicht reduzierende SDS-PAGE trennen. Es wurde natives Cox17* (1), Cox17*_{SSinnen} (2), Cox17*_{SSaußen} (3) und scCox17* (4) aufgetragen, wobei die Proben vor dem Auftragen nicht gekocht wurden.

Das CD-Spektrum von fehlverbrücktem Cox17* zeigt, dass es sich um ein entfaltetes Protein handelt, da die falsche Disulfidverbrückung die Ausbildung der nativen Helices verhindert (Abbildung S 17). Dass es sich tatsächlich um fehlverbrücktes und nicht etwa um reduziertes Cox17* handelt wurde anhand der Reaktion mit DTNB überprüft. Freie Thiole, wie im reduzierten Protein, reagieren mit DTNB und führen zu einer Zunahme der Absorption bei 412 nm (Abbildung 14 a). Für scCox17* konnte jedoch keine Absorption bei 412 nm beobachtet werden, was bedeutet, dass alle Cysteine oxidiert vorliegen (Abbildung 27 a). Um eine Analysemethode zur Unterscheidung von nativem und fehlverbrücktem Cox17* während der Oxidation durch Mia40 zu finden, wurde das Laufverhalten während einer SDS-PAGE untersucht (Abbildung 27 b). Cox17*, die Eindisulfidvarianten und fehlverbrücktes Cox17* können auf dem Gel voneinander getrennt werden. Die Proben wurden vor dem Auftragen nicht gekocht, so dass in den Proteinen eine Reststruktur erhalten bleibt, was zu unterschiedlicher Bindung von SDS und damit veränderten Laufweiten führen kann. Wird reduziertes Cox17* unter denaturierenden Bedingungen oxidiert, so bildet sich nur ein sehr geringer Teil an nativem Protein. Den größten Anteil machen also die in Abbildung 25 b und c gezeigten fehlverbrückten Spezies von Cox17* aus.

Zunächst wurde untersucht, ob fehlverbrücktes Cox17* durch Glutathion isomerisiert werden kann. Hierzu wurde scCox17* mit einer Mischung aus 3 mM reduziertem und 0,3 mM oxidiertem Glutathion inkubiert. GSH reduziert die falschen Disulfide, woraufhin die Cysteine erneut durch GSSG oxidiert werden können. Da ein Überschuss an GSH vorliegt sind die neu gebildeten Disulfide nur stabil, wenn es sich um die thermodynamisch günstigen, korrekten Verbrückungen handelt, weshalb schließlich nur das native Protein akkumuliert. Anhand der Analyse über SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass fehlverbrücktes Cox17* unter den gewählten Bedingungen durch eine Mischung aus reduziertem und oxidiertem

Glutathion innerhalb von ca. 2 h komplett in den nativen Zustand überführt wird (Abbildung 28 a).

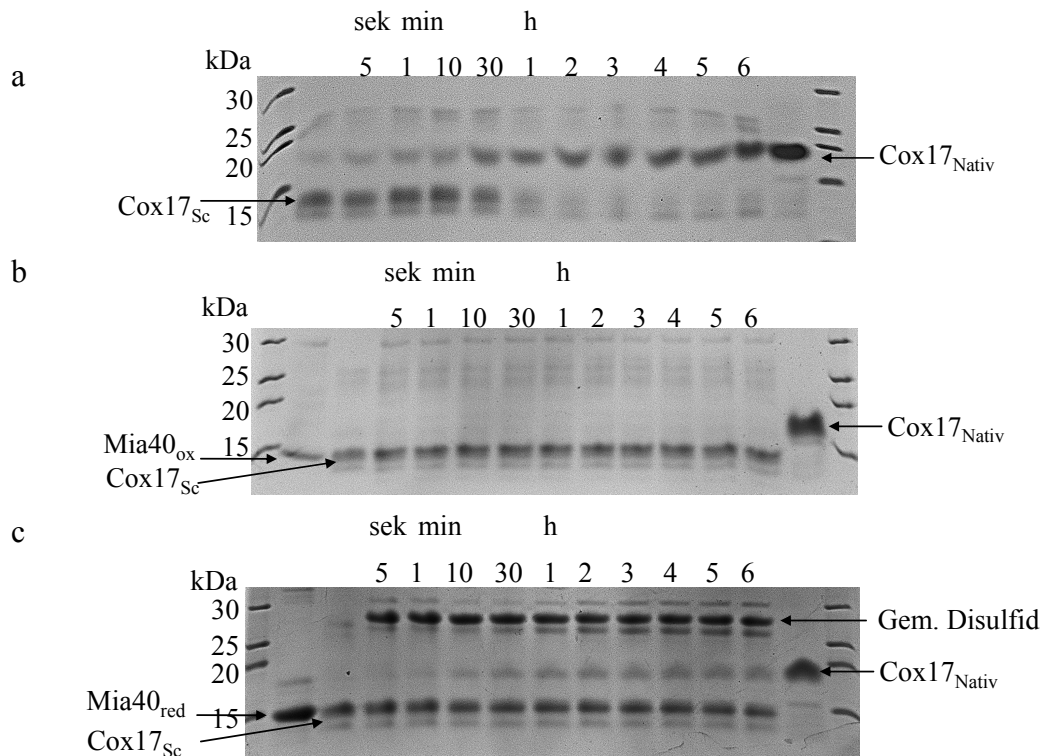


Abbildung 28: Isomerisierung von fehlverbrücktem Cox17. Es wurden 30 μ M fehlverbrücktes Cox17 mit (a) 0,3 mM GSSG und 3 mM GSH, (b) 10 μ M oxidiertem bzw. (c) 10 μ M reduziertem Mia40 bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat blockiert und die Proben durch nicht reduzierende SDS-PAGE analysiert.

Nachfolgend wurde untersucht, ob Mia40 Isomerasefunktion besitzt. Es wurden 30 μ M scCox17 mit je 10 μ M oxidiertem bzw. reduziertem Mia40 inkubiert. Bei Zugabe von oxidiertem Mia40 erfolgt wie erwartet keine Reaktion, da keines der Proteine freie Thiole für einen nukleophilen Angriff an einem Disulfid besitzt (Abbildung 28 b). Wird hingegen reduziertes Mia40 zugegeben, bildet sich innerhalb von 5 s das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und scCox17* aus (Abbildung 28 c). Da das fehlverbrückte Substrat, genau wie die reduzierte Form, keine native Struktur aufweist, wird es durch reduziertes Mia40 sehr effizient angegriffen. Das gemischte Disulfid aus Mia40 und scCox17* wird unter Bildung von nativem Cox17* aufgelöst, allerdings ist dieser Prozess sehr langsam und läuft nicht vollständig ab. Dies liegt zum einen daran, dass die gemischten Disulfide sehr langlebig sind und zum anderen, dass mit 10 μ M Mia40 ein sechsfacher Unterschuss gegenüber den Disulfiden in Cox17* vorliegt. Die maximale Ausbeute an nativem Cox17* beträgt also nur 16 % des eingesetzten fehlverbrückten Substrats. Höhere Mia40-Konzentrationen führten jedoch nicht zu einer verbesserten Isomeraseaktivität, da reduziertes Mia40 starke Dimerisierungstendenzen aufweist.

Ein weiterer Test für die Isomeraseaktivität von Oxidoreduktasen ist die Rückfaltung reduzierter RNase A, da die oxidative Faltung dieses Proteins immer unter Bildung nicht nativ oxidierten Intermediate abläuft (Creighton, 1995; Creighton, 1979; Scheraga *et al.*, 1984). Dieses Testsystem wurde verwendet um zu untersuchen, ob Mia40 auch nicht natürliche Substrate oxidieren und isomerisieren kann. Als Nachweis für die Bildung der vier nativen Disulfide in RNase A diente die Hydrolyse von cCMP, die zu einer Absorptionsänderung bei 296 nm führt und nur durch korrekt gefaltete RNase A katalysiert werden kann (Crook *et al.*, 1960).

Native RNase A hydrolysiert das im Reaktionsansatz vorhandene cCMP innerhalb einer Stunde fast vollständig (Abbildung 29 a). Die Rückfaltung reduzierter RNase A wurde zunächst durch eine Mischung aus 0,3 mM GSSG und 3 mM GSH induziert und die Bildung des nativen Proteins über die Hydrolyse von cCMP verfolgt (Abbildung 29 a). Nach einer Verzögerungsphase von ca. 10 min konnte ein Anstieg der Absorption detektiert werden, was zeigt, dass katalytisch aktive RNase A generiert wurde. In Anwesenheit der effizienten Disulfidisomerase PDI wird die oxidative Faltung stark beschleunigt. Auch durch Mia40 wurde die Regeneration nativer RNase A im Vergleich zum Glutathionsystem verbessert, wenngleich deutlich schwächer, als durch PDI. Die oxidative Faltung von RNase A konnte durch die katalytisch inaktive Mia40_{C296SC298S}-Variante nicht beschleunigt werden. Diese Ergebnisse deuten bereits daraufhin, dass Mia40 reduzierte RNase A durch die Katalyse von Oxidations- und Isomerisierungsreaktionen regenerieren kann. Dieser Test ist jedoch nicht quantifizierbar, da die Anzeigereaktion, nämlich die Hydrolyse von cCMP durch RNase A, einer Endprodukthemmung unterliegt und deshalb im Laufe der Reaktion langsamer wird. Aus diesem Grund wurde ein diskontinuierlicher Test für die quantitative Bestimmung der Isomeraseaktivität von Mia40 verwendet.

Im diskontinuierlichen RNase A-Test wurde die Rückfaltung von RNase A zunächst in geeigneten Bedingungen in Abwesenheit von cCMP induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dem Ansatz Proben entnommen und der Anteil an bereits nativ gefalteter RNase A durch Zugabe von cCMP und Messung der Absorptionsänderung bestimmt. Hierfür wurde die Anfangssteigung der Reaktionskinetik analysiert und mit der Anfangssteigung eines äquivalenten Testansatzes mit 100% nativer RNase A verglichen.

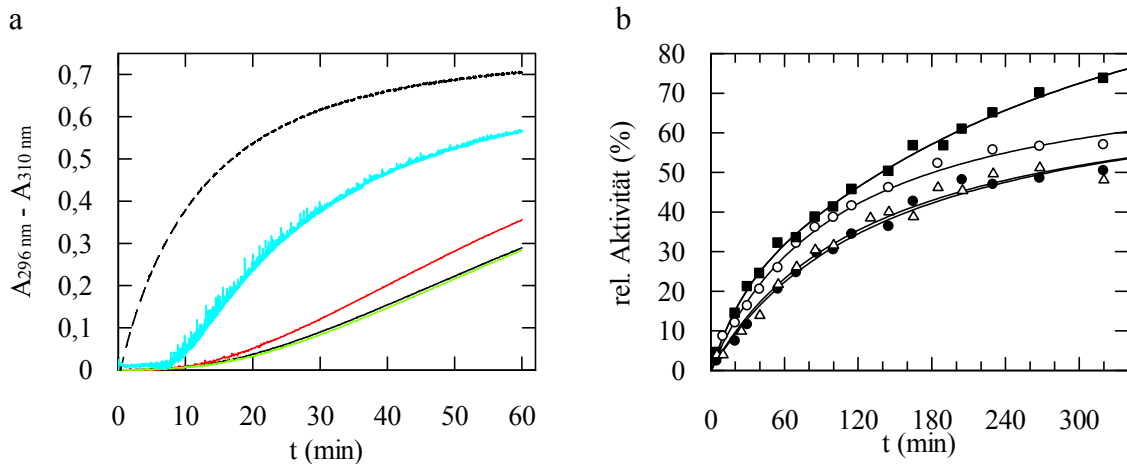


Abbildung 29: Oxidative Faltung von RNase A. (a) Es wurden je 5 μM reduzierte RNase A mit 0,3 mM GSSG, 3 M GSH und 2,5 mM cCMP inkubiert (—). Zusätzlich enthielten die Proben je 1 μM PDI (—), Mia40 (—) oder Mia40_{C296SC298S} (—). Ebenfalls gezeigt ist die Reaktion von 5 μM nativer RNase A mit 2,5 mM cCMP (---). Alle Messungen wurden in 0,1 M Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0 bei 25 °C anhand der Differenz der Absorption bei 296 nm und 310 nm verfolgt. (b) Es wurden je 5 μM reduzierte RNase A in 0,1 M Tris/HCl, pH^{25 °C} 8,0, 0,3 mM GSSG, 3 mM GSH in Abwesenheit von Enzym (●), bzw. in Anwesenheit von 1 μM (○) und 2 μM (■) Mia40 oder 2 μM Mia40_{C296SC298S} (Δ) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde 10 μl Rückfaltungsansatz zu 990 μl 0,9 mM cCMP in 0,1 M Bis-Tris, pH^{25 °C} 7,0, gegeben und die Absorptionsdifferenz bei 296 nm und 310 nm bei 25 °C aufgezeichnet. Es wurde die Anfangssteigung ermittelt und die relative Aktivität durch Vergleich mit der Reaktion von 5 μM nativer RNase A berechnet. Die durchgezogenen Linien sind optische Hilfslinien und keine Datenangleiche.

Die quantitative Auswertung des diskontinuierlichen RNase A-Rückfaltungstests ergab, dass Mia40 die oxidative Rückfaltung von RNase A beschleunigen kann (Abbildung 29 b). Dieser Effekt wird durch direkte Katalyse der Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen hervorgerufen und ist für katalytisch inaktives Mia40_{C296SC298S} nicht vorhanden. Die Beschleunigung der Oxidation von RNase A durch Mia40 gegenüber dem Glutathionsystem ist nicht sehr groß, da sich die Anfangssteigungen der Kurven nicht stark unterscheiden. Genau wie für die Isomerisierung von scCox17* ist die Isomeraseaktivität von Mia40 also eher gering. Ein großer Effekt ist aber auf den Anteil an nativer RNase A nach 5 h zu beobachten. Ohne Mia40 liegen ca. 50 % aller RNase A-Moleküle im Ansatz in der nativen Form vor, während es mit Mia40 75 % sind. Es könnte sein, dass Mia40 als Chaperon dafür sorgt, dass entfaltete RNase A-Spezies in Lösung gehalten werden und daher nicht aggregieren und für die Rückfaltung weiter zur Verfügung stehen.

Zusammengenommen zeigen die Experimente mit scCox17* und reduzierter RNase A, dass Mia40, genau wie PDI, die Funktionen einer Thioloxygenase und einer Disulfidisomerase in einem Enzym vereint. Es stellte sich nun die Frage, ob der Isomerisierungsprozess für die korrekte oxidative Faltung von Cox17* benötigt wird. In der bisherigen Analyse der Oxidation von Cox17* durch Mia40 wurden die Proben durch nicht denaturierende PAGE analysiert. Auf diesen Gelen zeigen jedoch natives und fehlverbrücktes Cox17* das gleiche Laufverhalten. Daher wurde die Oxidation zusätzlich durch SDS-PAGE analysiert, da sich gezeigt hatte, dass natives und fehlverbrücktes Cox17* auf diese Weise getrennt werden

können (Abbildung 27 b). Im Verlauf der Oxidation konnte jedoch kein fehlverbrücktes Cox17* nachgewiesen werden (Abbildung 30). Dies könnte bedeuten, dass Mia40 in Cox17* spezifisch native Disulfide einführt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass doch Fehlverbrückungen auftreten, diese Spezies jedoch sehr schnell wieder mit reduziertem Mia40 reagieren und daher nicht akkumulieren.

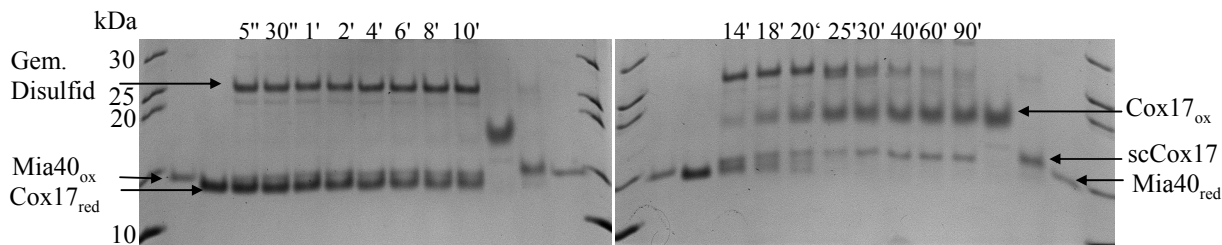


Abbildung 30: Oxidation von Cox17* durch Mia40 und Erv1. Es wurden 20 μ M reduziertes Cox17* mit 5 μ M Mia40 und 1 μ M Erv1 bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetamid blockiert und die Proben durch nicht reduzierende SDS-PAGE analysiert.

3.4.5 Kinetische Selektion und konformationelle Stabilisierung bestimmen die Reihenfolge der Disulfidbildung in Cox17* durch Mia40

Für die vollständige Oxidation von Cox17* müssen durch Mia40 zwei Disulfide in das Substrat eingeführt werden. Es konnten in dieser Arbeit keine Hinweise auf die Bildung fehlverbrückter Intermediate während der Oxidation von reduziertem Cox17* durch Mia40 gefunden werden. Möglicherweise ist Mia40 also in der Lage spezifisch native Disulfide zu bilden. Für die korrekte und vollständige Oxidation von Cox17* ist die Reihenfolge der Disulfidbildung von entscheidender Bedeutung, da Oxidationsintermediate, die die äußere Disulfidbrücke enthalten wegen der nativ ähnlichen Struktur nur sehr schlecht mit Mia40 interagieren (Abbildung 10 d). Die genaue Analyse der Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und den einzelnen Cysteinen in Cox17* hatte gezeigt, dass sich das kovalente Intermediat zwischen Mia40 und Cys36 in Cox17* besonders schnell bildet. Das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cys36 kann dann durch den Angriff der drei verbleibenden Cysteine des Substrats unter Ausbildung eines intramolekularen Disulfids in Cox17* aufgelöst werden. Der Angriff von Cys47 führt zur Bildung der nativen, inneren Disulfidbrücke, während sich durch den Angriff von Cys26 oder Cys57 jeweils ein nicht natives Disulfid bilden würde.

Die Kinetiken der Oxidation verschiedener Eindisulfid-Cox17*-Varianten durch Mia40 waren zuvor schon untersucht worden und wurden zur Bestimmung des weiteren Reaktionswegs ausgehend vom gemischten Disulfid zwischen Mia40 und Cys36 in Cox17* herangezogen. In Abbildung 31 ist der Zeitverlauf der Zunahme der oxidierten Eindisulfid-Cox17*-Spezies durch Reaktion der reduzierten Proteine mit Mia40 gezeigt. Von Bedeutung sind bei diesen Kinetiken insbesondere die ersten Minuten, da in diesem Bereich noch ein Überschuss von

Substrat gegenüber dem Enzym vorliegt und die Katalyse unter Substratsättigungsbedingungen ablaufen kann.

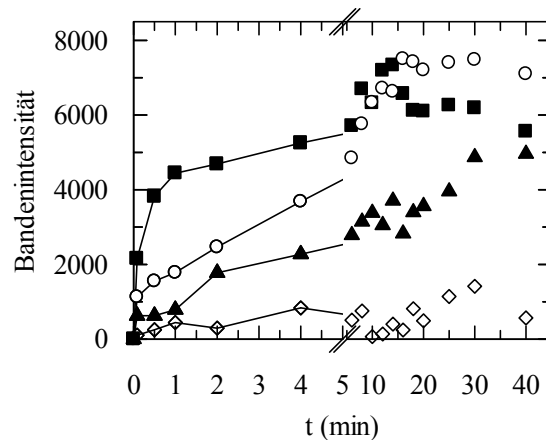


Abbildung 31: Oxidation verschiedener nativer und nicht nativer Disulfide in Cox17* durch Mia40. Es wurde die Oxidation von je 20 μM der reduzierten Eindisulfidvarianten von Cox17* durch 5 μM Mia40 und 1 μM Erv1 in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C verfolgt. Die entsprechenden Gele sind in Abbildung 24 b und c, sowie in Abbildung 26 a und b gezeigt. Die Bandenintensitäten der oxidierten Formen wurden mit dem Programm ImageJ ausgewertet und gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Gezeigt sind die Daten für Cox17*_{SSinnen} (■), Cox17*_{SSaußen} (○), Cox17*_{26C36C} (▲) und Cox17*_{36C57C} (◇). Die durchgezogenen Linien sind optische Hilfslinien und keine Datenangleiche.

Die Oxidationsverläufe der untersuchten Cox17*-Varianten unterscheiden sich deutlich voneinander. Besonders schnell wird die innere Disulfidbrücke zwischen Cys36 und Cys47 gebildet. Die Intensität der Bande des oxidierten Proteins erreicht bereits nach 30 s die halbmaximale Intensität. Diese Variante kann vermutlich besonders effizient aus dem gemischten Disulfid mit Mia40 freigesetzt werden, da Cys47, das am intermolekularen Disulfid zwischen Mia40 und Cox17* angreift sich in unmittelbarer Nähe des gemischten Disulfids befindet und damit in einer hohen effektiven Konzentration vorliegt. Deutlich langsamer wird das zweite native Disulfid zwischen Cys26 und Cys57 gebildet. Hier ist erst nach ca. 4 min die halbmaximale Intensität der oxidierten Spezies erreicht. Da diese Substratvariante über Cys57 ebenfalls sehr schnell das kovalente Intermediat mit Mia40 bilden kann muss die langsamere Oxidation an einer weniger effizienten Freisetzung des Substrats aus dem gemischten Disulfid liegen. Dies ist durchaus plausibel, da die beiden Substratcysteine durch 30 Aminosäuren getrennt und ohne die Ausbildung der nativen Helices weit voneinander entfernt sind.

Auch die Bildung eines nicht nativen Disulfids zwischen Cys26 und Cys36 wird durch Mia40 katalysiert. Diese Reaktion ist jedoch noch langsamer, als die Bildung des äußeren Disulfids. Dies zeigt, dass die Entfernung der beiden Cysteine in der Primärsequenz nicht das einzige Kriterium für die Oxidationsgeschwindigkeit ist. Cys26 und Cys36 liegen entlang der Proteinkette sogar näher zusammen, als die Cysteine des inneren Disulfids, Cys36 und 47. Dass die Oxidation dennoch deutlich langsamer ist kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnten die beiden Cysteine, die auf derselben Helix liegen, durch die frühe Ausbildung

dieses Sekundärstrukturelements voneinander ferngehalten werden. Weiterhin ist Cox17*_{26C36C} ein entfaltetes Protein, so dass das nicht native Disulfid nicht durch die Proteinstruktur stabilisiert wird und es leicht durch reduziertes Mia40 wieder aufgelöst werden kann. Ein letzter Punkt könnte sein, dass auch die Reaktivität des am gemischten Disulfid angreifenden Substratcysteins entscheidend für die Oxidationsgeschwindigkeit ist. Wenn diese Reaktivität für Cys26 gering ist, so ist auch die Freisetzung des oxidierten Proteins langsamer, als für Cox17*_{SSinnen}.

Als letzte Variante war mit Cox17*_{36C57C} ebenfalls ein Substrat mit nicht nativem Disulfid untersucht worden. Für diese Variante konnte keine Oxidation durch Mia40 beobachtet werden. Das gemischte Disulfid mit Mia40 wird zwar schnell ausgebildet, ist jedoch über 90 min stabil und die Bande des oxidierten Proteins wurde praktisch nicht sichtbar. Dies kann entweder daran liegen, dass das gemischte Disulfid nicht aufgelöst werden kann, oder daran, dass das oxidierte Protein sofort wieder das kovalente Intermediat mit reduziertem Mia40 bildet. Dies erscheint eher unwahrscheinlich, da reduziertes Mia40 weitgehend durch Erv1 im Reaktionsansatz reoxidiert wird und somit nicht für die Reduktion des gebildeten Disulfids in Cox17*_{36C57C} zur Verfügung stehen sollte.

Unter Berücksichtigung dieser deutlichen Unterschiede in den Oxidationskinetiken der Eindisulfidvarianten von Cox17* wurde ein Modell aufgestellt, wie Mia40 mit hoher Spezifität natives Cox17* bilden kann (Abbildung 32). Zu Beginn der Reaktion von Mia40 mit reduziertem Cox17* bildet sich durch kinetische Selektion, vermittelt über hydrophobe Interaktionen, präferenziell und sehr schnell das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cys36 aus Cox17*, wobei das Gleichgewicht der Reaktion sehr weit auf der Seite des Produkts liegt. Ausgehend von diesem Zustand sind theoretisch Weiterreaktionen in drei Richtungen möglich, die vom angreifenden Cystein aus dem Substrat bestimmt werden. Eine der Reaktionen, nämlich die Auflösung des gemischten Disulfids durch Angriff von Cys57, wurde experimentell nicht beobachtet, weshalb sich die Anzahl der Reaktionswege auf zwei reduziert. Die Bildung eines nicht nativen Disulfids durch Angriff von Cys26 an Cys36 im gemischten Disulfid mit Mia40 ist möglich, jedoch sehr langsam. Deutlich schneller ist der Angriff von Cys47 unter Freisetzung eines teiloxidierten Cox17*-Intermediats mit der inneren Disulfidbrücke. Dies bedeutet, dass, wiederum durch kinetische Kontrolle, die Bildung eines nativen Disulfids gegenüber der Bildung einer nicht nativen Verbrückung klar bevorzugt ist. Hinzu kommt, dass Cox17*_{26C36C} vollständig entfaltet ist, während Cox17*_{SSinnen} zumindest teilweise strukturiert vorliegt (Abbildung S 17). Das Disulfid Cys36-Cys47 wird also durch die beginnende konformationelle Faltung schon geringfügig stabilisiert. In Cox17*_{SSinnen} ist die MISS/ITS-Sequenz an den Positionen 50, 51 und 54, die die Bindung an Mia40 vermittelt (Abbildung 17), weiterhin zugänglich, so dass die nicht kovalente Komplexbildung mit einem weiteren Mia40-Molekül noch gut möglich ist. Hierdurch wird die Einführung des zweiten Disulfids erleichtert. Durch das Einführen beider Disulfide in das Substrat wird der stabile, native Zustand erreicht, der nicht mehr mit Mia40 interagiert.

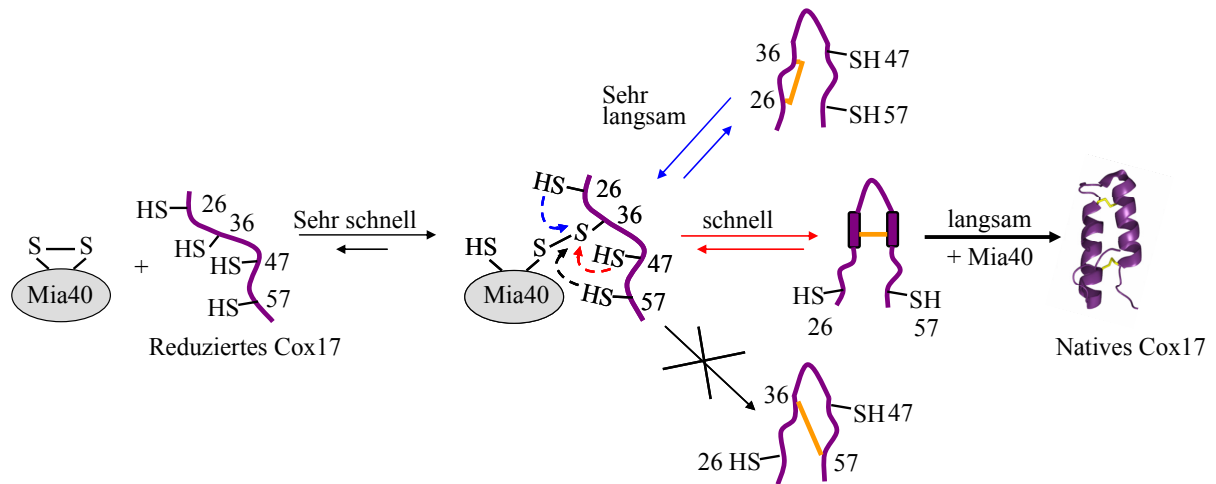


Abbildung 32: Schematischer Ablauf der Bildung der Disulfidbrücken in Cox17 katalysiert durch Mia40. Reduziertes Cox17 bildet über Cys36 sehr schnell das gemischte Disulfid mit Mia40. Dieser Zustand kann durch Angriff der drei verbleibenden Cysteine des Substrats aufgelöst werden. Nur der Angriff von Cys47 am gemischten Disulfid führt zur Bildung eines teiloxydierten Intermediats von Cox17 mit einem nativen Disulfid, das zum nativen, volloxydierten Cox17 weiterreagieren kann. Die Cysteine sind gemäß der Aminosäuresequenz nummeriert, Disulfide in Cox17 sind als gelbe Balken angedeutet.

Die Bildung nativer Disulfide ist kinetisch begünstigt und der letzte Schritt der Katalyse, nämlich die Freisetzung des nativen, volloxydierten Substrats, liefert als quasi irreversibler Schritt die thermodynamische Triebkraft für die Oxidation. Daher wird vermutlich hauptsächlich korrekt oxidiertes Cox17* durch Mia40 gebildet. Wird dennoch fehlverbrücktes Substrat frei, so kann dies durch die Disulfidisomerasefunktion von Mia40 korrigiert werden. Cox17* mit falscher Disulfidverbrückung wird von reduziertem Mia40 unter Ausbildung des gemischten Disulfids angegriffen und kann dann in den nativen Zustand überführt werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ein Zusammenspiel aus kinetischer Kontrolle von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen und der Stabilisierung von nativen Disulfiden durch die Sekundärstruktur des Substrats den Mechanismus der Substratoxidation durch Mia40 bestimmt. Die Information über den korrekten Faltungszustand wird dabei nicht von Mia40 selbst, sondern vom Substrat geliefert. Die konformationelle Faltung von Cox17* und das damit verbundene Vergraben von hydrophoben Bereichen und Disulfiden im Proteininnern dient als Anzeiger für den nativen Zustand des Substrats und treibt damit die Oxidationsreaktion.

3.5 Hydrophobe Interaktionen zwischen Mia40 und Cox17 stabilisieren das gemischte Disulfid

Mia40 besitzt einige Eigenschaften, die es deutlich von den klassischen Thioredoxin-ähnlichen Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen unterscheidet. Besonders auffallend ist die Langlebigkeit des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und seinen Substraten. Dies führt auch zu einer wesentlich geringeren katalytischen Effizienz, da das oxidierte Substrat nur sehr langsam aus dem Komplex mit Mia40 freigesetzt wird. Der Vergleich der Oxidation von Cox17* durch Mia40, DsbA und PDI zeigt, dass es sich hierbei um eine intrinsische Eigenschaft von Mia40 und nicht von Cox17* handelt. In allen Fällen erfolgt die Interaktion zwischen reduziertem Cox17* und der Oxidoreduktase sehr schnell und es kann bereits nach 5 s kein reduziertes Substrat mehr nachgewiesen werden. Im Fall von Mia40 bildet sich sehr schnell das gemischte Disulfid mit reduziertem Cox17*. Es ist sehr langlebig und wird nur langsam unter Bildung von oxidiertem Cox17* aufgelöst (Abbildung 33 a). Für DsbA und PDI hingegen konnte selbst nach sehr kurzen Reaktionszeiten keine deutliche Bande eines Heterodimers aus Oxidoreduktase und Substrat nachgewiesen werden (Abbildung 33 b,c). Für DsbA kann auch mit anderen Substraten der Zustand des gemischten Disulfides nicht populiert werden, da die intramolekularen Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen sehr schnell ablaufen (Wunderlich *et al.*, 1993; Zapun *et al.*, 1993). Für PDI konnten dagegen die gemischten Disulfide mit einem Substrat aus Zellen isoliert werden, allerdings nur bei Verwendung nicht verwandter, viraler Proteine (Molinari & Helenius, 1999). Sowohl mit DsbA, als auch mit PDI ist die Oxidation von Cox17* bereits im Sekundenbereich vollständig abgelaufen und damit deutlich schneller, als für Mia40. Auffallend ist, dass bei der Oxidation von Cox17* durch DsbA eine zusätzliche Bande sichtbar wird, die eine etwas größere Laufweite zeigt, als das reduzierte Substrat. Hierbei könnte es sich um fehlverbrücktes Cox17* handeln. DsbA besitzt keine Disulfidisomerasefunktion und kann daher einmal gebildete, nicht native Disulfide nicht wieder auflösen. Bei vier Cysteinen und einer statistischen Verteilung der gebildeten Disulfide, sollten 1/3 natives und 2/3 fehlverbrücktes Cox17* gebildet werden. Dies stimmt in etwa mit den Bandenintensitäten überein, wobei beachtet werden muss, dass Cysteine, die sich räumlich nahe sind, preferentiell verknüpft werden und eine rein statistische Verteilung nicht erwartet werden kann. Die zusätzliche Bande taucht auch während der Oxidation durch PDI in den ersten Sekunden auf, wird dann jedoch durch die effiziente Isomerase PDI vollständig in natives Cox17* umgewandelt.

Um die molekularen Grundlagen für die Langlebigkeit der gemischten Disulfide zwischen Mia40 und Cox17* zu bestimmen, wurden die Einflüsse von Faktoren, die generell die Stabilität von Disulfiden und die Raten von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen bestimmen, untersucht. Hierbei handelt es sich beispielsweise um die Ionisierungseigenschaften und die chemische Natur der Umgebung von Cysteinen, sowie die mechanische Spannung, die durch die kovalente Bindung zweier Cysteine in ein System eingeführt wird.

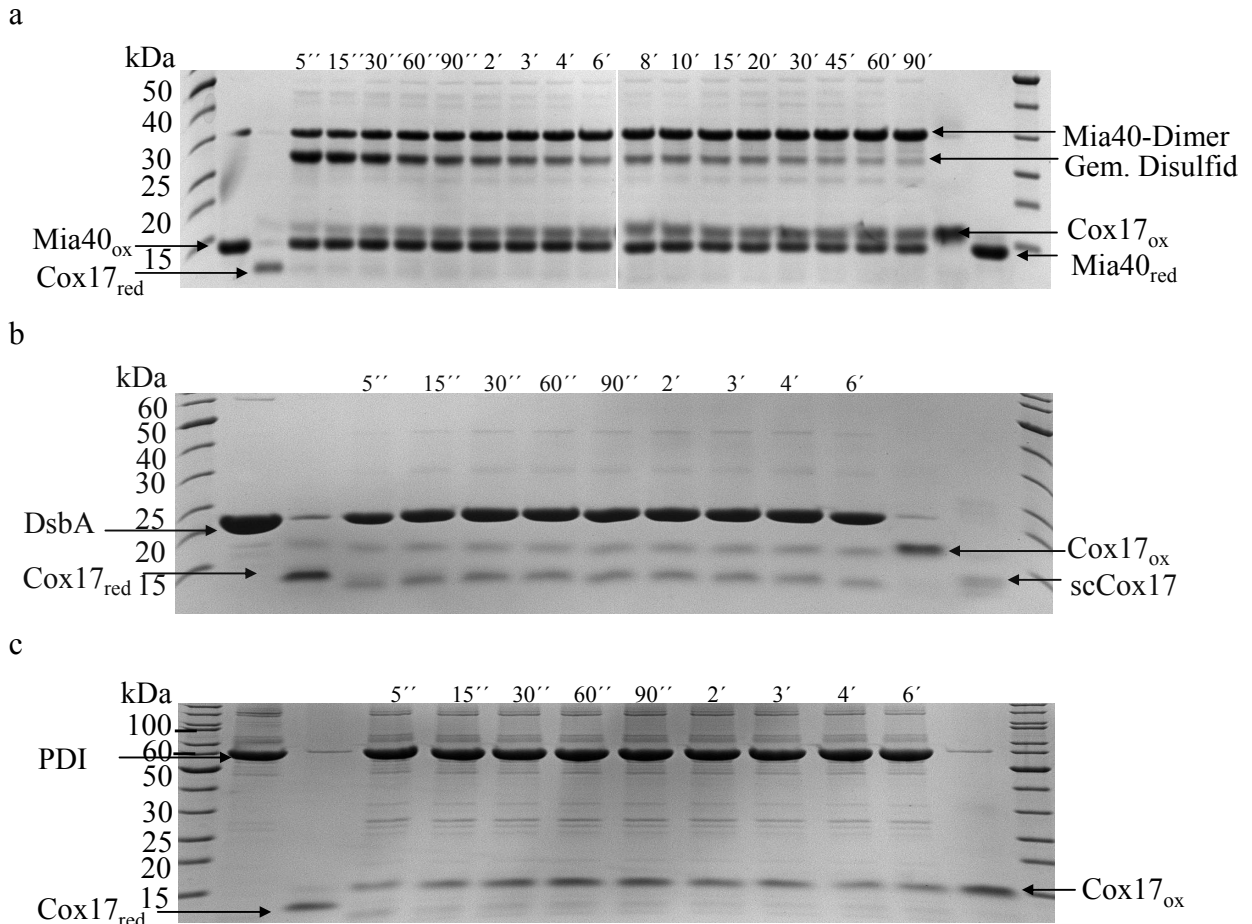


Abbildung 33: Oxidation von Cox17* durch verschiedene Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen. Es wurden je 20 μM reduziertes Cox17* und 50 μM (a) Mia40, (b) DsbA und (c) PDI in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat gestoppt und die Proben durch nicht reduzierende SDS-PAGE analysiert.

3.5.1 Einfluss des katalytischen Motivs auf die Stabilität des gemischten Disulfids

Die katalytischen Cysteine sind in Mia40 als CPC-Motiv angeordnet (Abbildung 34). Dies ist sehr ungewöhnlich, da die meisten bekannten Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen CXXC-Motive enthalten. Die beiden Cysteine in Mia40 sind nur von einem Rest getrennt, was in der oxidierten Form zur Einführung von Spannung in das System und damit zu einer Destabilisierung des Disulfids führen kann. In kurzen Peptiden konnte gezeigt werden, dass die Gleichgewichtskonstante zwischen oxidiert und reduzierter Form um Faktor 40 auf die Seite der reduzierten Form verschoben wird, wenn die beiden Cysteine statt durch zwei Alanine nur durch ein Alanin getrennt sind (Zhang & Snyder, 1989). Übertragen auf das CPC-Motiv in Mia40 würde dies bedeuten, dass der reduzierte Zustand bevorzugt ist und damit die Oxidaseaktivität erhöht wird. Die experimentellen Befunde deuten jedoch, im Vergleich zu DsbA oder PDI, auf eine eher geringe Oxidationsleistung hin. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die ungewöhnlichen Eigenschaften der Aminosäure Prolin sein, die neben der *trans*- auch in der *cis*-Konformation vorliegen kann und damit dem gespannten

Zustand entgegenwirken könnte. Allerdings liegt die Peptidbindung von Pro297 in allen verfügbaren Strukturen von Mia40 im *trans*-Zustand vor.

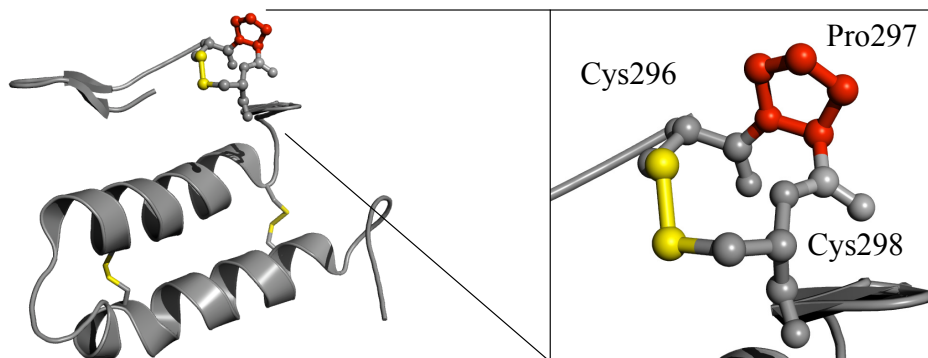


Abbildung 34: Struktur des aktiven Zentrums von Mia40. Gezeigt ist die Kristallstruktur von Mia40 aus *S. cerevisiae* (Reste 284-365). Schwefelatome der Cysteine sind in gelb, Prolin297 zwischen den katalytischen Cysteinen ist rot dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol nach PDB-Eintrag 2ZXT erstellt.

Das CPC-Motiv ist eine Aminosäuresequenz, die in der Natur sehr selten vorkommt und eher der Koordination von Metallionen durch die reduzierten Cysteine, als der Bildung redoxaktiver Disulfide dient (Cater *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2006). Es war zuvor gezeigt worden, dass Hefezellen mit einer Mia40-Variante, in der Pro297 gegen Gly ausgetauscht wurde, keine Wachstumsdefekte im Vergleich zum Wildtyp-Stamm aufweisen (Terziyska *et al.*, 2009). Da das ungewöhnliche CPC-Motiv zwischen den Spezies hoch konserviert ist, ist jedoch zu vermuten, dass das Prolin eine Funktion während der Katalyse hat. Um den Einfluss des CPC-Motivs auf die Effizienz der Substratoxidation zu untersuchen, wurden Varianten hergestellt, in denen die katalytischen Cysteine als CAC-Motiv (Mia40_{CAC}), oder entsprechend der Reste in PDI und DsbA, als CGHC- bzw. CPHC-Motiv angeordnet sind (Mia40_{CGHC} und Mia40_{CPHC}).

Es zeigte sich, dass diese Sequenzvariationen im aktiven Zentrum von Mia40 die Oxidationsleistung weiter herabsetzen. Alle Mia40-Varianten bilden nach wie vor sehr schnell das gemischte Disulfid mit Cox17* aus. Für Mia40_{CAC} wird oxidiertes Cox17* ähnlich schnell freigesetzt wie beim Wildtyp-Protein, allerdings ist die Reaktion innerhalb des gewählten Zeitbereiches nicht vollständig und es kann auch nach 90 min noch die Bande des gemischten Disulfids detektiert werden (Abbildung 35 a). Auch Mia40 mit dem PDI-äquivalenten CGHC-Motiv bildet oxidiertes Cox17*, allerdings sehr viel langsamer als das Wildtyp-Protein und Mia40_{CAC} und ebenfalls unvollständig (Abbildung 35 b). Die geringste Oxidationsleistung zeigt Mia40 mit dem CPHC-Motiv aus DsbA. Hier konnte kaum natives Cox17* nachgewiesen werden und das gemischte Disulfid blieb über 90 min hinweg stabil (Abbildung 35 c).

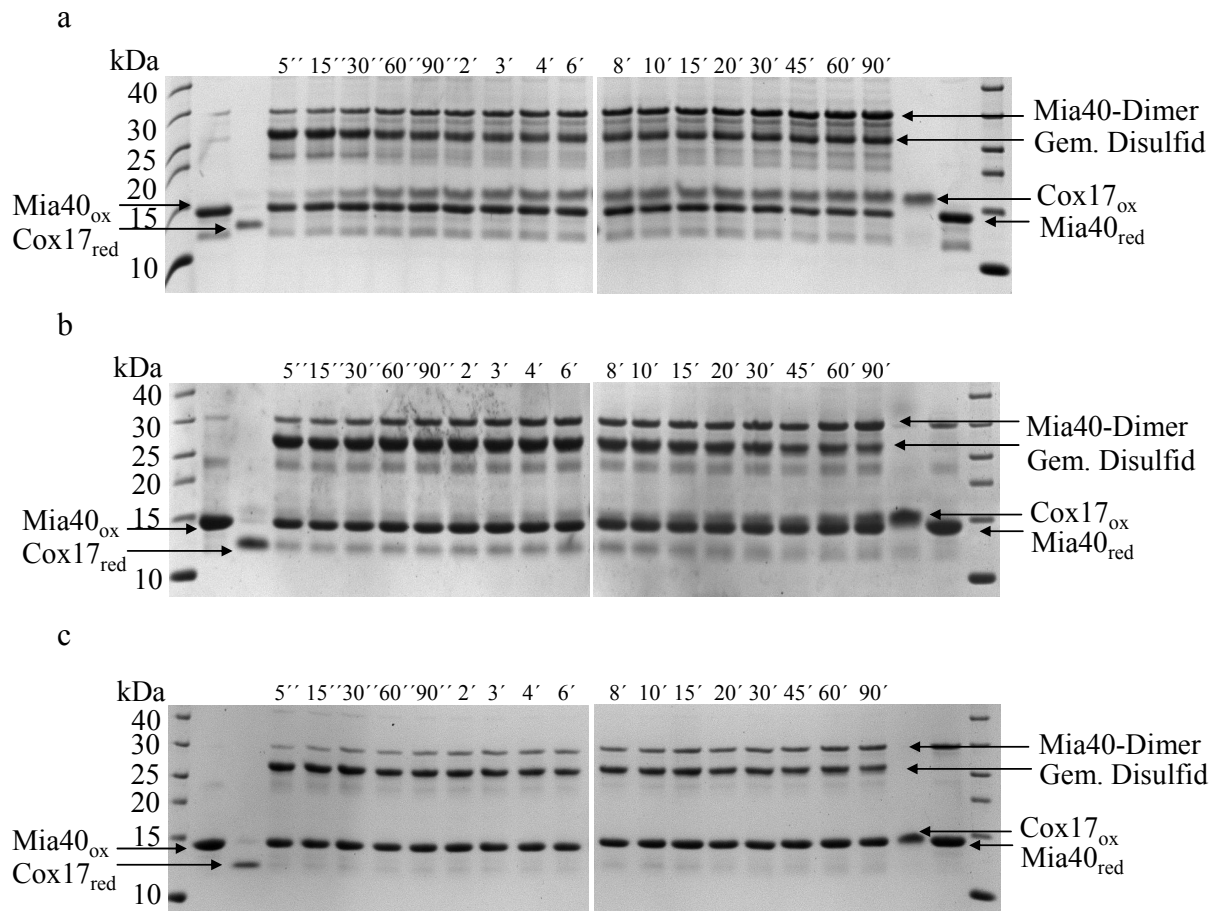


Abbildung 35: Oxidation von Cox17* durch verschiedene Mia40-Varianten. Es wurden je 20 μM reduziertes Cox17* und 50 μM (a) Mia40_{CAC}, (b) Mia40_{CGHC} und (c) Mia40_{CPHC} in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat gestoppt und die Proben durch nicht reduzierende SDS-PAGE analysiert.

Insgesamt zeigen diese Sequenzvariationen im katalytischen Zentrum von Mia40, dass die Lebensdauer des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und den Substraten nicht allein durch die Sequenz des katalytischen Disulfids bedingt ist. Zwar zeigen sich Unterschiede zwischen den verwendeten Varianten, die allerdings die kovalente Bindung von Cox17* eher verstärken. Ein effizienter Substratumsatz wie bei DsbA und PDI konnte nicht generiert werden.

3.5.2 Die oxidierte Form von Mia40 ist stabilisiert

Die thermodynamische Stabilität von oxidiert und reduzierter Form eines Proteins beeinflusst neben anderen Faktoren die Stabilität der Disulfidbrücke und damit bei einer Thioloxydase die Oxidationskraft. Für die bakterielle Oxidase DsbA wurde beispielsweise gefunden, dass die reduzierte Form 15 kJ mol⁻¹ stabiler ist, als das oxidierte Protein und das Disulfid deshalb labil ist (Zapun *et al.*, 1993). Mia40 zeigt eher geringe Oxidationskraft, was an einer Destabilisierung der reduzierten Form liegen könnte.

Um dies zu untersuchen, wurde die Stabilität von oxidiertem und reduziertem Mia40 gegenüber thermischer Denaturierung untersucht. Da reduziertes Mia40 während des Aufheizens vermutlich reoxidiert würde, wurde die Mia40_{C296SC298S}-Variante als Analogon verwendet. Es zeigte sich, dass Mia40 ein extrem stabiles Protein ist und im zugänglichen Temperaturbereich bis 105 °C kein vollständiger Entfaltungsübergang aufgezeichnet werden konnte. Da somit keine Analyse der Daten auf der Basis eines Zweizustandsmodells möglich war, konnten die Daten nur halbquantitativ ausgewertet werden. Um die Analyse zu vereinfachen, wurde die erste Ableitung der Datenpunkte bestimmt, was der Steigung der Kurve entspricht. Der Punkt der maximalen Steigung ist der Übergangsmittelpunkt der Denaturierungskurve und damit der T_M -Wert. Allerdings ist die Unsicherheit des so bestimmten Wertes groß. Dennoch lässt sich klar erkennen, dass Mia40_{C296SC298S} gegenüber oxidiertem Mia40 deutlich destabilisiert ist. Der Punkt der maximalen Steigung wurde zu ca. 83 °C abgeschätzt, während er für oxidiertes Mia40 im Bereich von 88 °C liegt. Damit zeigt Mia40 ein anderes Verhalten als DsbA, das in der reduzierten Form erheblich stabiler ist, als in der oxidierten Form.

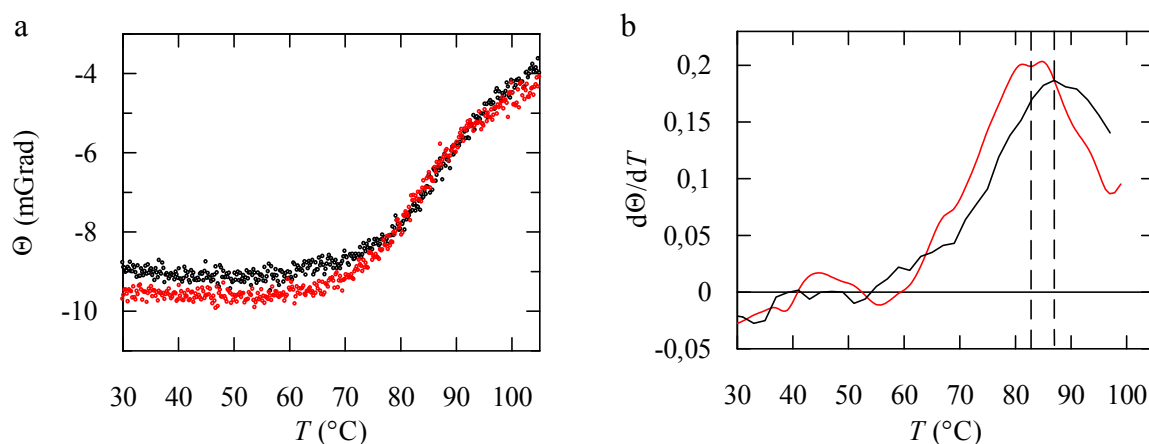


Abbildung 36: Thermische Denaturierung von Mia40. (a) Gezeigt ist die thermische Entfaltung von je 1 μ M Mia40 (○) und Mia40_{C296SC298S} (○) in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 verfolgt über das CD-Signal bei 222 nm. (b) Es wurden die Steigungen der Denaturierungskurven aus (a) durch Ableitung der Kurven ermittelt und gegen die Temperatur aufgetragen. Die durchbrochenen Linien zeigen näherungsweise den Übergangsmittelpunkt.

3.5.3 Ionisierungseigenschaften des katalytischen Disulfids von Mia40

Während der Oxidation des Substrats durch Mia40 laufen mehrere Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen ab. Zunächst greift ein Cystein des Substrats am katalytischen Disulfid von Mia40 unter Ausbildung des gemischten Disulfids an. In diesem Zustand kann entweder das freie Cystein von Mia40 angreifen, was der Rückreaktion entspricht, oder ein weiteres Cystein des Substrats, was zur Oxidation des Substrats führt (Abbildung 6).

Im Fall von Mia40 liegt das Gleichgewicht der initialen Reaktion weit auf der Seite des gemischten Disulfids. Auch wenn Cox17* nur ein Cystein enthält und die Reaktion nicht in

produktiver Weise in Richtung Substratoxidation ablaufen kann, scheint die Rückreaktion keine große Rolle zu spielen. Für DsbA beispielsweise wird der Zustand des gemischten Disulfids mit Cox17*_{1Cys} kaum populiert, da die Rückreaktion zu oxidiertem DsbA energetisch günstig ist. In Mia40 wird im gemischten Disulfid der Angriff des zweiten, freien Cysteins des katalytischen Disulfids verhindert. Da hierbei das Thiolanion die reaktive Spezies ist, könnte dies durch Modulation des pK-Werts erfolgen. Bei einem hohen pK-Wert ist der Anteil an deprotoniertem Thiolat bei physiologischem pH-Wert und damit auch die Reaktivität gering.

Um die pK-Werte der Cysteine von Mia40 und Cox17* zu bestimmen, wurde die pH-Abhängigkeit der Reaktion mit dem niedermolekularen Thiolreagenz DTNB untersucht. Der pK-Wert von DTNB liegt bei 4,5 und hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Messungen, da DTNB fast im gesamten Messbereich vollständig deprotoniert vorliegt (Riddles *et al.*, 1979). Die Kinetik der Reaktion von freien Cysteinen mit DTNB kann anhand der Absorptionzunahme bei 412 nm verfolgt werden (Abbildung 14 a).

Zunächst wurde die Reaktion von DTNB mit Mia40-Varianten untersucht, die jeweils nur eines der beiden katalytischen Cysteine enthalten. Ihre Reaktion mit DTNB wird mit steigendem pH-Wert schneller. Oxidiertes Mia40 und Mia40_{C296SC298S} zeigen erwartungsgemäß nach Mischung mit DTNB keine Absorptionsänderung, da sie keine freien Cysteine enthalten (Abbildung 37 a). Die apparenten Raten der Reaktion zeigen den Deprotonierungsgrad der katalytischen Cysteine von Mia40 in Abhängigkeit des pH-Wertes. Eine Auswertung durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung ergab einen pK-Wert von 6,3 für Cys296 und 7,1 für Cys298 (Abbildung 37 c, Tabelle 5). Damit sind die pK-Werte gegenüber einem frei zugänglichen Cystein (pK \approx 8,3) erniedrigt, zeigen aber keine so extreme Abweichung von diesem Wert wie das N-terminale Cystein von DsbA (pK 3,5) (Nelson & Creighton, 1994). Dieses Ergebnis würde darauf hindeuten, dass in reduziertem Mia40 Cys296 das reaktivere der beiden Cysteine ist und Disulfide angreift, wie beispielsweise im ersten Schritt der Reoxidation durch Erv1. Experimentell wurde jedoch Cys298 als wichtiger Rest für die Ausbildung gemischter Disulfide mit Erv1 identifiziert (Terziyska *et al.*, 2009). Vermutlich spielt hier neben dem pK-Wert auch die Ausrichtung der Cysteine der Reaktionspartner zueinander eine Rolle.

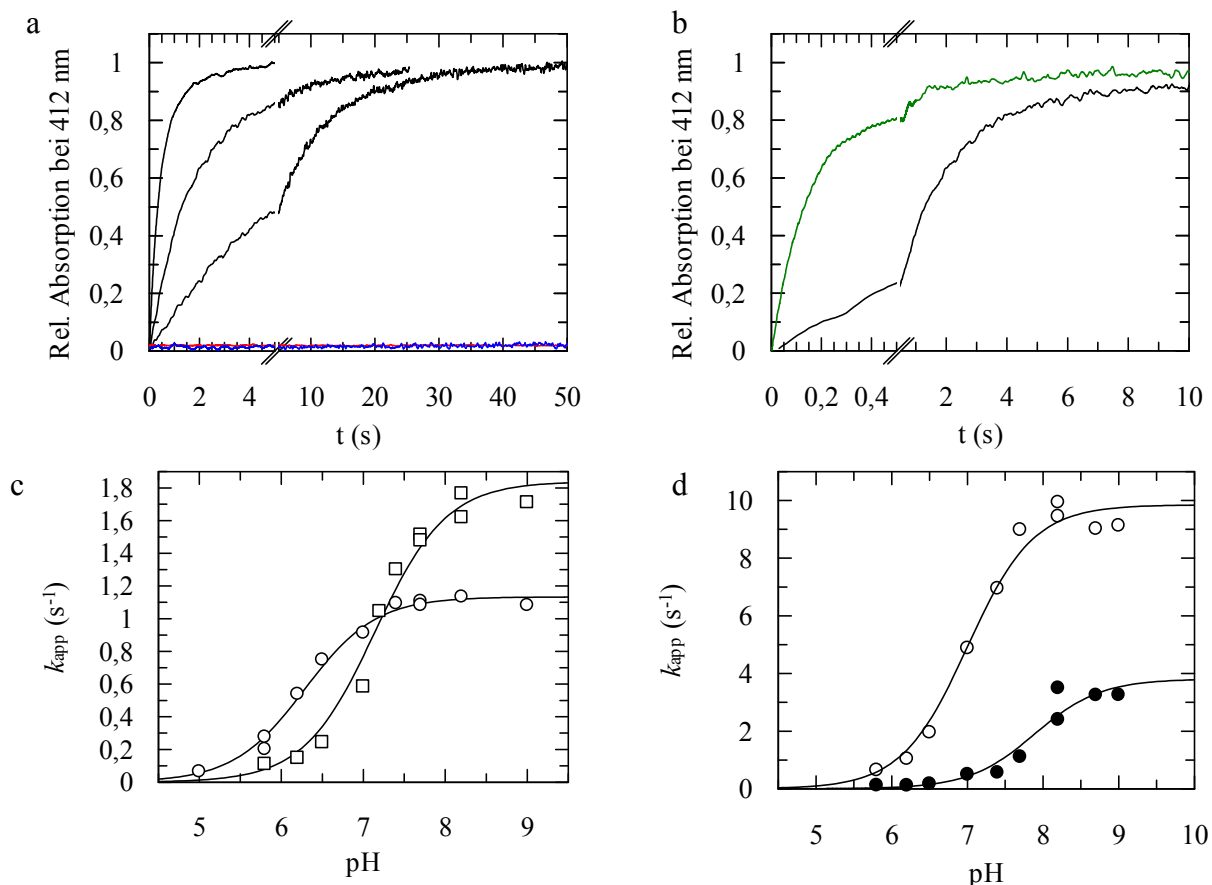


Abbildung 37: Bestimmung der pK-Werte der katalytischen Cysteine von Mia40. Gezeigt ist die Reaktion von 50 μ M DTNB mit je (a) 5 μ M Mia40_{C298S} (—) bei pH 6,2, 7,4 und 8,2 (von unten nach oben), sowie zusätzlich mit Mia40 (—) und Mia40_{C298SC298S} (—) und (b) 5 μ M Mia40_{C298S} (—) bzw. reduziertem Mia40 (—) in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C. Es wurde die Reaktion von je 5 μ M (c) Mia40_{C298S} (O) bzw. Mia40_{C296S} (□) und (d) reduziertem Mia40 mit 50 μ M DNTB verfolgt. Die Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 5,7, 6,2, 6,5, 7, 7,4, 7,7, 8,2 bzw. 0,1 M Tris/HCl pH 7,7, 8,2, 9, bzw. 0,1 M Glycin pH 9, 9,5, 10,5 bei 15 °C durchgeführt. Als Messsonde diente in allen Fällen die Absorption bei 412 nm. An die Fluoreszenzverläufe wurden Exponentialfunktionen angeglichen und die erhaltenen Ratenkonstanten gegen den pH-Wert aufgetragen. Die pK-Werte wurden über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 8) ermittelt und sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Für die Ausbildung des gemischten Disulfids mit Substraten ist der Angriff eines Thiolats aus dem Substrat am katalytischen Disulfid von Mia40 relevant. Um zu bestimmen, welches der beiden Cysteine in Mia40 eher das gemischte Disulfid mit dem Substrat ausbildet, muss ihre Eignung als Abgangsgruppe betrachtet werden. Studien mit niedermolekularen Molekülen zeigten, dass Cysteine mit niedrigem pK-Wert besser als Abgangsgruppe geeignet sind (Wilson *et al.*, 1977). Demnach wäre Cys296 die bessere Abgangsgruppe und Cys298 würde entsprechend die kovalente Bindung mit dem Substrat eingehen. Importexperimente mit den Substraten Tim13 und Tim9 deuteten an, dass beide Cysteine in Mia40 gemischte Disulfide ausbilden können, jedoch war die Menge an gebildetem Intermediat bei Substitution von Cys298 reduziert (Terziyska *et al.*, 2009). Möglicherweise spielen bei der Interaktion von Mia40 mit dem Substrat weitere Faktoren eine Rolle, wie beispielsweise die Zugänglichkeit der Cysteine und die Ausrichtung des Substrats.

In den verwendeten Mia40-Varianten wurde jeweils eines der beiden Cysteine gegen Ser ausgetauscht, d.h. es befindet sich ein polarer Rest in der unmittelbaren Umgebung des untersuchten Cysteins, was die Ionisierungseigenschaften und damit den pK-Wert beeinflussen kann. Daher wurde versucht die pK-Werte beider Cysteine simultan in reduziertem Mia40 zu bestimmen. Voraussetzung hierfür ist, dass die Reaktionen der beiden Cysteine mit DTNB kinetisch getrennt sind, so dass beide gleichzeitig detektiert werden können. Die Ergebnisse für die Eincystein-Varianten legen nahe, dass die Raten über einen weiten pH-Bereich unterschieden werden können (Abbildung 37 c). Tatsächlich konnten für die Reaktion von reduziertem Mia40 mit DTNB zweiphasige Absorptionsverläufe detektiert werden (Abbildung 37b). Beide apparenten Ratenkonstanten beschreiben pH-abhängige Titrationskurven, die der Deprotonierung der zwei Cysteine entsprechen sollten (Abbildung 37 d). Aus den Kurvenangleichen wurden pK-Werte von 7,0 und 7,9 erhalten. Dies bedeutet, dass die Werte gegenüber den isolierten Cysteinen jeweils um 0,7 bzw. 0,8 Einheiten erhöht sind. Demnach hat die Substitution durch Ser einen deutlichen Einfluss auf die Deprotonierung des jeweils anderen Cysteins. Die gleichzeitige Bestimmung der pK-Werte benachbarter Reste liefert nur apparente Werte, da der Protonierungszustand eines Cysteins den des zweiten Restes beeinflusst. Wird das Cystein mit dem niedrigeren pK-Wert deprotoniert, so befindet sich mit dem entstehenden Thiolatanion eine negative Ladung in Nachbarschaft des zweiten Cysteins. Diese unterdrückt wegen der Abstoßung der gleichnamigen Ladungen die Deprotonierung und erhöht so den zweiten pK-Wert. Hinzu kommt im hier angewendeten System, dass das erste Cystein nach der Deprotonierung ein gemischtes Disulfid mit DTNB ausbildet, was ebenfalls die Deprotonierung und die Reaktion des benachbarten Cysteins mit DTNB beeinflusst.

Neben der Verschiebung der pK-Werte in reduziertem Mia40 gegenüber den einzeln untersuchten Cysteinen fällt auf, dass die apparenten Raten der Reaktion mit DTNB, insbesondere des Cysteins mit dem niedrigen pK-Wert, deutlich höher sind (Tabelle 5). Im deprotonierten Zustand reagieren die Cysteine des reduzierten Proteins mit ca. 10 s^{-1} bzw. 4 s^{-1} im Vergleich zu ca. $1,5 \text{ s}^{-1}$ für Mia40_{C296S} und Mia40_{C298S} (Abbildung 37 c,d). Ein Grund hierfür könnte eine bessere Zugänglichkeit der Cysteine für DTNB sein, wofür jedoch deutliche strukturelle Umlagerungen des Proteins, ausgelöst durch Substitution von Cys gegen Ser, nötig wären. Dass nur eine Reaktion deutlich beschleunigt ist liegt vermutlich daran, dass nach Ausbildung des gemischten Disulfids mit DTNB die Reaktion des zweiten Cysteins mit einem weiteren DTNB ungünstig ist.

Tabelle 5: pK-Werte von Mia40 und Cox17

Protein	pK ₁	k _{S⁻1} (s ⁻¹)	pK ₂	k _{S⁻2} (s ⁻¹)
Mia40 _{C298S}	6,28 ± 0,04	1,13 ± 0,02		
Mia40 _{C296S}	7,14 ± 0,07	1,84 ± 0,07		
Mia40 reduziert	7,00 ± 0,07	9,9 ± 0,3	7,90 ± 0,2	3,8 ± 0,5
Mia40+Cox17* _{26C}	8,35 ± 0,05	1,12 ± 0,03		
Mia40+Cox17* _{36C}	8,24 ± 0,03	2,09 ± 0,03	7,81 ± 0,08	0,12 ± 0,01
Mia40+Cox17* _{47C}	8,08 ± 0,07	2,66 ± 0,09	7,8 ± 0,2	0,11 ± 0,01
Mia40+Cox17* _{57C}	7,30 ± 0,10	9,8 ± 0,5	8,0 ± 0,1	2,7 ± 0,2
Cox17* _{26C}	8,49 ± 0,03	1,50 ± 0,03		
Cox17* _{36C}	8,22 ± 0,03	2,39 ± 0,04		
Cox17* _{47C}	8,21 ± 0,05	2,37 ± 0,06		
Cox17* _{57C}	8,11 ± 0,03	4,00 ± 0,06		
Mia40 _{C296SC298S} +Cox17* _{26C}	8,41 ± 0,08	1,40 ± 0,03		
Mia40 _{C296SC298S} +Cox17* _{36C}	8,26 ± 0,08	2,63 ± 0,06		
Mia40 _{C296SC298S} +Cox17* _{47C}	8,30 ± 0,04	2,47 ± 0,05		
Mia40 _{C296SC298S} +Cox17* _{57C}	8,20 ± 0,03	3,62 ± 0,06		

Die pK-Werte wurden wie in Abbildung 37 bis Abbildung 40 beschrieben bestimmt. Die apparente Rate der vollständig deprotonierten Form (S⁻) wurde aus dem Endwert des Angleichs an die Daten bestimmt. Es sind die Werte und die Standardabweichung des Angleichs angegeben. Alle Ergebnisse wurden in unabhängigen Messungen reproduziert.

Es sollte nun untersucht werden, ob der pK-Wert des verbleibenden Cysteins von Mia40 im gemischten Disulfid mit dem Substrat nach oben verschoben und so für seine hohe Stabilität verantwortlich. Hierzu wurde zunächst das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17*_{1Cys} durch kurze Inkubation der beiden Proteine populierte. In früheren Messungen konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion sehr schnell ist und das Gleichgewicht, mit Ausnahme der Reaktion von Cox17*_{26C}, fast ausschließlich auf Seite des Produkts liegt (Abbildung 11). Abbildung 38 zeigt schematisch, welche Reaktionen möglich sind, wenn Mia40 und Cox17*_{1Cys} koinkubiert und anschließend mit DTNB gemischt werden. Es kann sowohl freies, als auch nicht kovalent an Mia40 gebundenes Cox17*_{1Cys} mit DTNB reagieren. Im gemischten Disulfid ist das einzige freie Cystein das verbleibende freie Cystein von Mia40.

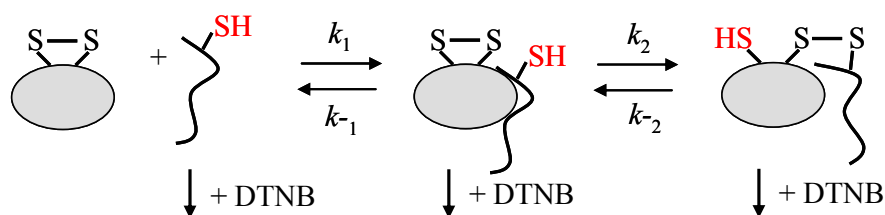


Abbildung 38: Schema der Reaktion von Mia40, Cox17*_{1Cys} und DTNB. Mia40 und Cox17*_{1Cys} bilden zunächst einen nicht kovalenten Komplex aus, aus dem sich dann das gemischte Disulfid bildet. In allen drei Reaktionsphasen sind freie Cysteine vorhanden (rot markiert), die mit DTNB reagieren können.

Nach Mischung von Mia40 und Cox17*_{26C} mit DTNB konnte eine pH-abhängige Reaktion aufgezeichnet werden (Abbildung 39 a). Der Angleich der Daten ergab einen pK-Wert von 8,4 (Tabelle 5). Da Cys26 nur zu einem sehr geringen Anteil das gemischte Disulfid mit Mia40 ausbildet, handelt es sich vermutlich um den pK-Wert des Cysteins in Cox17*_{26C}. Waren im Substrat die Cysteine 36, 47, oder 57 vorhanden so konnten zwei Reaktionen mit gut getrennten Raten detektiert werden (Abbildung 39 b-c). Für die Reaktionen der Mischungen aus Mia40 und Cox17*_{36C} bzw. Cox17*_{47C} mit DTNB waren die apparenten Raten, sowie die resultierenden pK-Werte annähernd identisch. Die schnelle Reaktion erreicht eine maximale Reaktionsrate von ca. $2,5 \text{ s}^{-1}$ und ergibt einen pK-Wert des reagierenden Cysteins von ca. 8,1. Die zweite Reaktion ist mit $0,1 \text{ s}^{-1}$ deutlich langsamer und der pK-Wert des zugehörigen Cysteins mit 7,8 etwas niedriger (Tabelle 5). Bei der Reaktion von Mia40 und Cox17*_{57C} mit DTNB wurde eine Reaktionsphase beobachtet, deren maximale apparente Rate mit $2,7 \text{ s}^{-1}$ und deren korrespondierender pK-Wert von 8,0 sehr gut mit den schnellen Phasen der Reaktionen in Anwesenheit von Cys36 und Cys47 in Cox17* übereinstimmten. Während bei diesen Substratvarianten eine zusätzliche langsame Phase auftrat, konnte für Cox17*_{57C} jedoch eine zweite, schnellere Phase mit einer apparenten Rate von ca. 10 s^{-1} aufgezeichnet werden. Diese unterscheidet sich nicht nur in der Reaktionsgeschwindigkeit mit DTNB, sondern auch im pK-Wert, der mit 7,3 niedriger ist, als für die anderen Substratproteine.

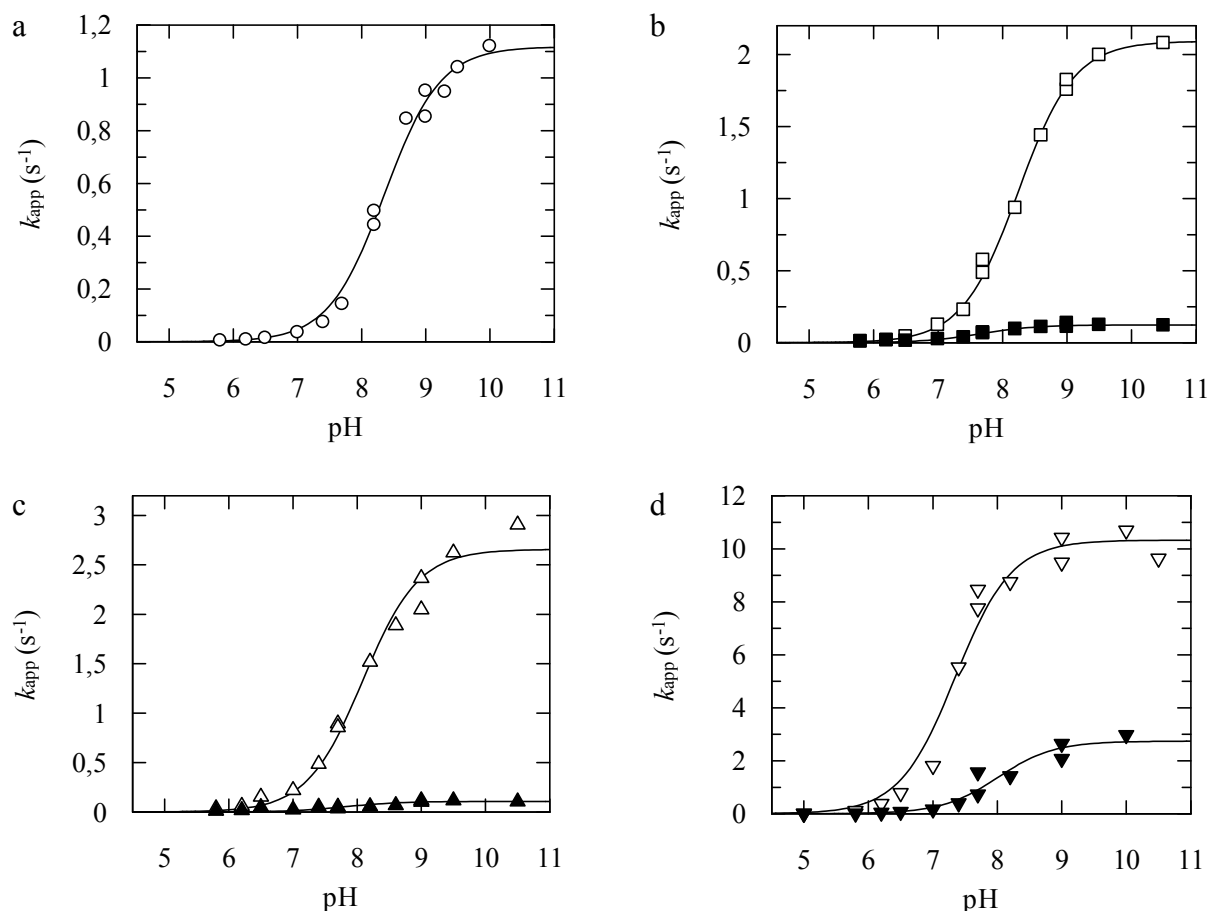


Abbildung 39: Bestimmung der pK-Werte von Cox17* und Mia40. Es wurde die Reaktion von 50 μM DTNB mit einer Mischung aus je 5 μM Mia40 und 5 μM (a) Cox17*₂₆ (b) Cox17*_{36C}, (c) Cox17*_{47C} und (d) Cox17*_{57C} verfolgt. Als Messsonde diente die Absorption von TNB bei 412 nm. Die Messungen wurden in 0,1 M Kaliumacetat, pH 5,0, 5,8 bzw. 0,1 M Kaliumphosphat, pH 5,8, 6,2, 6,5, 7, 7,4, 7,7 bzw. 0,1 M Tris/HCl pH 7,7, 8,2, 8,6, 9, bzw. 0,1 M Glycin pH 9, 9,5, 10,5 bei 15 °C durchgeführt. An die Fluoreszenzverläufe wurden Exponentialfunktionen angeglichen und die erhaltenen Ratenkonstanten gegen den pH-Wert aufgetragen. Die pK-Werte wurden über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 8) ermittelt und sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Die beiden gemessenen Phasen konnten den reagierenden Cysteinen von Mia40 und Cox17* (Abbildung 38) zunächst nicht zugeordnet werden. Daher wurden als Referenzen zusätzlich die Reaktionen der vier Varianten von Cox17* mit jeweils einem Cystein mit DTNB analysiert, um so die pK-Werte der Cysteine von Cox17* in Abwesenheit von Mia40 zu erhalten. Sie wurden zusätzlich auch in Gegenwart von Mia40_{C296SC298S} bestimmt. In dieser Variante sind die Cysteine des katalytischen Disulfids gegen Ser ausgetauscht, so dass sich nur der nicht kovalente Komplex ausbilden kann (Abbildung 38). Auf diese Weise können die pK-Werte der Cysteine von Cox17* im nicht kovalenten Komplex mit Mia40 erhalten werden.

Für die vier Cysteine in isoliertem Cox17* ergaben sich Reaktionsraten mit DTNB zwischen 1,5 und 4,0 s^{-1} und pK-Werte zwischen 8,1 und 8,5 (Tabelle 5). Annähernd dieselben Kurvenverläufe wurden erhalten, wenn Cox17*_{1Cys} im nicht kovalenten Komplex mit Mia40_{C296SC298S} vorliegt. Hier ergaben sich pK-Werte zwischen 8,2 und 8,4. Auch die

apparenten Raten der vollständig deprotonierten Cysteine waren in beiden Messungen praktisch gleich. Dies zeigt, dass sich weder die Zugänglichkeit der Cysteine, noch die chemische Natur der Umgebung bei der nicht kovalenten Bindung an Mia40 ändert. Alle pK-Werte liegen in dem für Cysteine typischen Bereich.

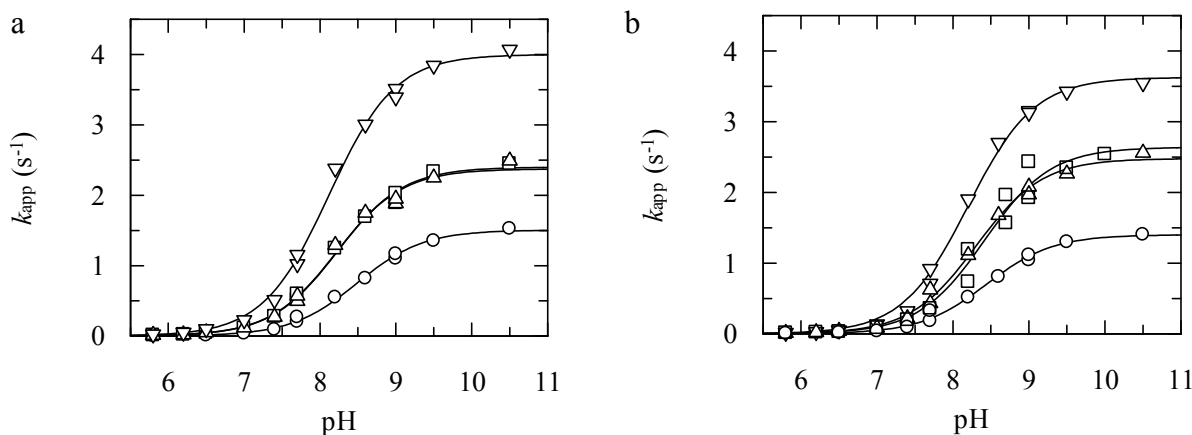


Abbildung 40: Bestimmung der pK-Werte von Cox17*. Es wurde die Reaktion von 50 μM DTNB mit (a) je 5 μM Cox17_{26C} (○), Cox17_{36C} (□), Cox17_{47C} (Δ) und Cox17_{57C} (▽), bzw. (b) einer Mischung aus je 5 μM Mia40_{C296SC298S} und 5 μM Cox17_{26C}, Cox17_{36C}, Cox17_{47C} und Cox17_{57C} verfolgt. Als Messsonde diente die Absorption von TNB bei 412 nm. Die Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 5,8, 6,2, 6,5, 7, 7,4, 7,7, bzw. 0,1 M Tris/HCl pH 8,2, 8,6, 9, bzw. 0,1 M Glycin pH 9, 9,5, 10,5 bei 15 °C durchgeführt. An die Fluoreszenzverläufe wurden Exponentialfunktionen angeglichen und die erhaltenen Ratenkonstanten gegen den pH-Wert aufgetragen. Die pK-Werte wurden über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 8) ermittelt und sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Die pK-Werte und die apparenten Raten der einzelnen Cysteine in isoliertem Cox17* und im nicht kovalenten Komplex mit Mia40 wurden mit den Werten des gemischten Disulfids aus Mia40 und Cox17*_{ICys} verglichen. Hieraus ergab sich, dass für Cox17*_{36C} und Cox17*_{47C} vermutlich die schnellere Phase der Reaktion des Cysteins in Cox17* mit DTNB entspricht. Demzufolge entspricht die langsame Phase der Reaktion des freien Cysteins von Mia40 im gemischten Disulfid. Die pK-Werte der langsamen Phase von jeweils 7,8 stimmen sehr gut mit dem höheren der beiden pK-Werte in reduziertem Mia40 (pK 7,9) überein. Allerdings sind die apparenten Raten mit 0,1 s⁻¹ signifikant langsamer, als in reduziertem Mia40 (k_{app} 3,8 s⁻¹). Dies deutet darauf hin, dass die Zugänglichkeit des Cysteins in Mia40 für DTNB durch die kovalente Bindung an Cox17* stark verringert wird. Für Cox17*_{57C} unterscheidet sich die schnelle Phase sowohl in den apparenten Raten, als auch im pK-Wert deutlich von den Werten von isoliertem Cox17*_{57C}. In diesem Fall scheint die langsamere Phase die Reaktion von Cox17*_{57C} mit DTNB anzuzeigen. Diese ist etwas langsamer, als im isolierten Protein, zeigt jedoch einen ähnlichen pK-Wert. Demnach würde die schnelle Phase die Reaktion des freien Cysteins von Mia40 reflektieren, die mit einem pK-Wert von 7,0 und einer apparenten Rate von 9,9 s⁻¹ relativ gut mit den Werten des gemischten Disulfids von 7,3 und 9,8 s⁻¹ übereinstimmt. Dies würde jedoch bedeuten, dass in diesem Fall, im Gegensatz zu

Cox17*_{36C} und Cox17*_{47C}, das Cystein in Mia40 mit dem niedrigeren pK-Wert mit DTNB reagiert, oder aber sich der pK-Wert des anderen Cysteins in diesem Komplex um 0,6 nach unten verschiebt. Die endgültige Zuordnung der Phasen konnte in diesem Fall nicht geklärt werden. Im Fall von Cox17*_{26C} konnte nur eine Reaktion detektiert werden, die in Rate und pK-Wert den Ergebnissen des isolierten Substrats entspricht. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Cys26 in Cox17* nur zu einem sehr geringen Ausmaß gemischte Disulfide mit Mia40 ausbildet und daher keine Reaktion eines Cysteins in Mia40 zu beobachten war.

Insgesamt zeigte die Bestimmung der pK-Werte, dass die Ionisierungseigenschaften der Cysteine in Cox17* und Mia40 im Komplex kaum verändert sind und daher eine Verschiebung der pK-Werte der Cysteine des katalytischen Disulfids in Mia40 nicht für die extreme Langlebigkeit des gemischten Disulfids verantwortlich ist.

3.5.4 Die Stabilität des gemischten Disulfids

Wie bereits zuvor angesprochen, sind die gemischten Disulfide von Mia40 mit seinen Substratproteinen sehr langlebig und die Freisetzung des oxidierten Substrats entsprechend langsam. Die molekulare Ursache hierfür könnte eine thermodynamische Stabilisierung des Zustands des gemischten Disulfids gegenüber reduziertem Mia40 sein, was die Oxidationstendenz von Mia40 verringern würde. Daher wurde neben oxidiertem und reduziertem Mia40 auch das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und einem Substratprotein im Bezug auf seine Stabilität analysiert. Das gemischte Disulfid wurde hergestellt, indem äquimolare Mengen Mia40 und Cox17*_{1Cys} gemischt und die Reaktion sofort durch Zugabe eines 20-fachen Überschusses an Iodacetat gestoppt wurde. Das gemischte Disulfid wurde durch Gelfiltrationschromatographie von den Monomeren getrennt (Abbildung S 18). Auf diese Weise konnten die gemischten Disulfide zwischen Mia40 und Cox17*_{36C}, Cox17*_{47C} und Cox17*_{57C} isoliert werden. Da Cox17*₂₆ nur zu einem sehr geringen Teil kovalent an Mia40 bindet, konnte dieses Heterodimer nicht erhalten werden.

Die Stabilitäten der Proteine wurden durch thermische Denaturierung anhand der Änderung des CD-Signals untersucht (Abbildung 41 a). Da die Denaturierung, wie für Mia40, im zugänglichen Temperaturbereich unvollständig war, wurde zur besseren Visualisierung des Übergangsmittelpunktes zusätzlich die Ableitung der Kurven gebildet (Abbildung 41 b). Es zeigte sich, dass die kovalente Bindung von Cox17* zu einer deutliche Stabilisierung von Mia40 führt. Das gemischte Disulfid mit Cys36 zeigt einen Übergangsmittelpunkt nahe 96 °C, etwa 8 °C höher als für isoliertes, oxidiertes Mia40 (Tabelle 6). Die gemischten Disulfide mit Cys47 und Cys57 sind sogar so stabil, dass bis zu einer Temperatur von 102 °C der Wendepunkt der Kurve nicht erreicht ist. Zwischen Mia40 und dem Substrat scheinen sich sehr günstige Wechselwirkungen auszubilden, die zu einem enormen Stabilitätsgewinn der globulären Domäne von Mia40 führen. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für einen arretierten Komplex aus DsbA und RNaseT1 gefunden, in dem das Substrat destabilisiert und die Thioloxygenase stabilisiert ist (Frech *et al.*, 1996). Da DsbA und entfaltete RNaseT1

thermodynamisch günstige, nicht kovalente Wechselwirkungen eingehen sind die bindungskompetenten Formen, also oxidiertes DsbA und reduzierte RNaseT1, stabilisiert.

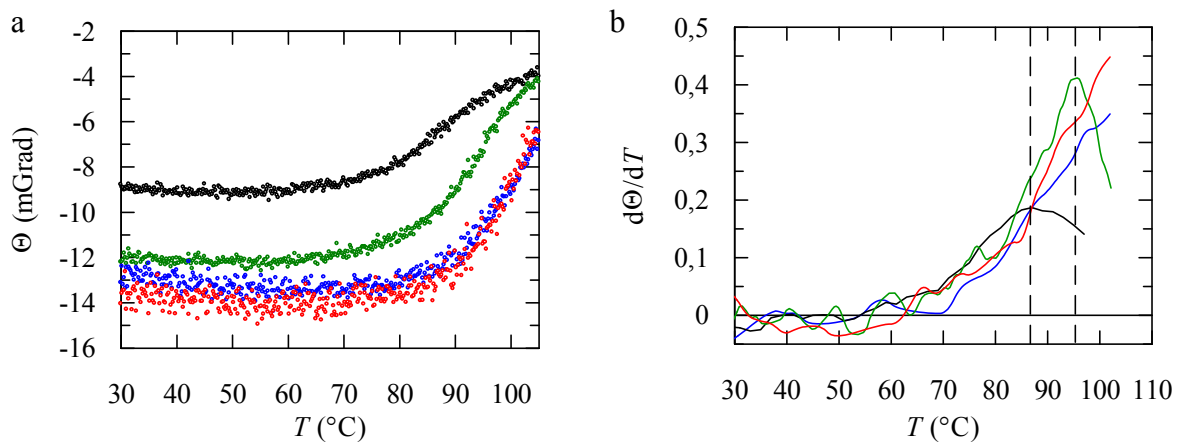


Abbildung 41: Thermische Denaturierung der gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17*. (a) Gezeigt ist die thermische Entfaltung von je 1 μM Protein in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 verfolgt über das CD-Signal bei 222 nm für Mia40 (\circ), sowie die gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17*_{36C} (\circ), Cox17*_{47C} (\circ) und Cox17*_{57C} (\circ). (b) Gezeigt sind die Ableitungen der Kurven aus (a). Die durchbrochenen Linien zeigen näherungsweise den Übergangsmittelpunkt. Die ermittelten T_M -Werte sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Der kovalente Komplex zwischen Mia40 und dem Substratprotein Cox17* ist ein energetisch günstiger Zustand. Die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen führen zu einem Anstieg des T_M -Wertes um mindestens 8 °C gegenüber oxidiertem Mia40 und sogar mindestens 13 °C gegenüber reduziertem Mia40. Im gemischten Disulfid erreicht Mia40 also ein lokales energetisches Minimum, das zwischen oxidiertem und reduziertem Mia40 als Zustände höherer Energie liegt. Daher wird diese Form bevorzugt gebildet und ist langlebig.

3.5.5 Das Reduktionspotential von Mia40

Das Reduktionspotential gibt die Elektronenaffinität einer Verbindung an und stellt damit ein direktes Maß für die Oxidationskraft eines Disulfids dar. Je positiver das Reduktionspotential ist, desto höher ist die Elektronenaffinität und desto höher ist die Oxidationskraft. Das biochemische Standardreduktionspotential E^0 wird für physiologische Reaktionen verwendet, da es für pH 7,0 definiert ist. Die Reduktionspotentiale der Thiothredoxin-ähnlichen Oxidoreduktasen variieren sehr stark und liegen zwischen -270 mV für das stark reduzierende Thiothredoxin (Moore *et al.*, 1964) und -120 mV für die starke Oxidase DsbA (Inaba & Ito, 2002). PDI weist mit -180 mV ein intermediäres Potential auf, was der Tatsache Rechnung trägt, dass zusätzlich zur Oxidasefunktion auch eine Reduktaseaktivität vorliegt (Lundstrom & Holmgren, 1993).

Für Mia40 wurde das Reduktionspotential mit dem Redoxpaar GSSG und GSH zu -200 mV bestimmt, was für ein Protein mit Oxidasefunktion sehr stark negativ ist (Banci *et al.*, 2009). Als Sonde für den Reduktionsgrad von Mia40 diente in diesen Experimenten die Trp-

Fluoreszenz, die im reduzierten Protein ca. dreifach höher ist, als im oxidierten. Zunächst sollte der Literaturwert des Reduktionspotentials unter identischen Bedingungen überprüft werden. Hierzu wurde oxidiertes Mia40 mit 0,1 mM GSSG und unterschiedlichen GSH-Konzentrationen inkubiert. Die Proben wurden anschließend nicht anhand von Fluoreszenz, sondern über nicht denaturierende Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 42 a). Es zeigte sich, dass sich unter den gewählten Bedingungen ein Gleichgewicht aus oxidiertem und reduziertem Mia40 ausbildet. Allerdings bildet sich auch, genau wie mit Substratproteinen, ein stabiles gemischtes Disulfid mit Glutathion, das erst ab ca. 5 mM GSH reduziert wird. Das Redoxpaar GSSG und GSH eignet sich daher nicht zur Bestimmung des Reduktionspotentials von Mia40, da die Auswertung nach einem Zweizustandsmodell mit ausschließlich oxidierten und reduzierten Spezies nicht zulässig ist.

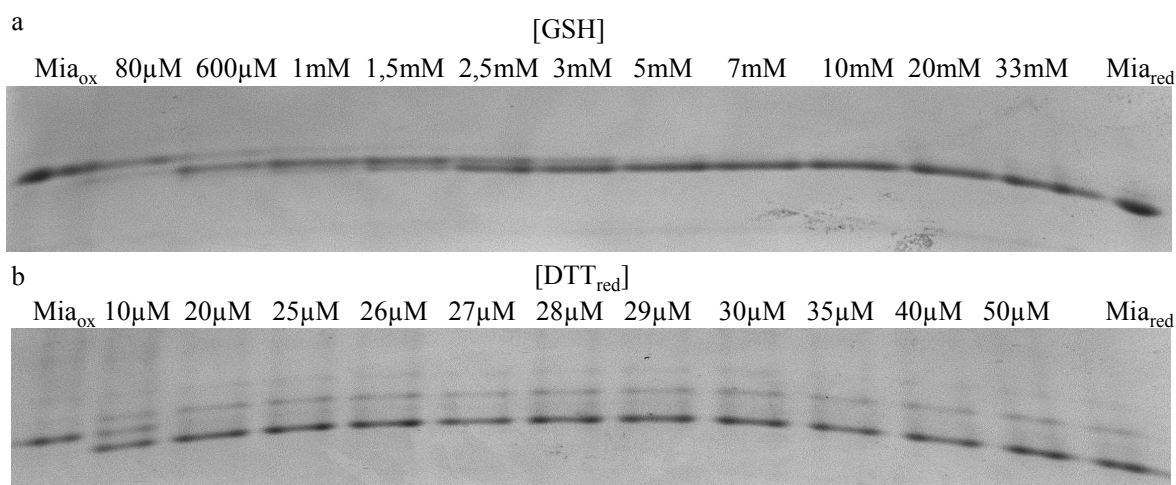


Abbildung 42: Reduktion von Mia40 durch GSH und DTT. Es wurden je 10 µM Mia40 mit (a) 0,1 mM GSSG und den angegebenen GSH-Konzentrationen und (b) 25 mM DTT_{ox} und den angegebenen DTT_{red}-Konzentrationen in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 für 6 h bei 15 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Iodacetat gestoppt und die Proben durch nicht denaturierende PAGE analysiert.

Eine weitere Möglichkeit das Reduktionspotential von Mia40 zu bestimmen, besteht in der Verwendung einer Mischung aus oxidiertem und reduziertem DTT. DTT ist in der oxidierten Form extrem stabil, da ein energetisch günstiges Ringsystem entsteht und bildet daher keine stabilen gemischten Disulfide aus. Allerdings konnte auch mit DTT das Reduktionspotential nicht bestimmt werden, da Mia40 selbst in Anwesenheit eines großen Überschusses an oxidiertem DTT bereits durch stöchiometrische DTT-Konzentrationen reduziert wird und damit keine Titrationskurve aufgezeichnet werden konnte (Abbildung 42 b). Weiterhin ist der Fehler beim Erstellen der DTT-Stammlösung im Vergleich zu dem geringen Konzentrationsbereich, der für die vollständige Reduktion benötigt wird, sehr groß.

Eine weitere Möglichkeit Reduktionspotentiale für Proteine zu bestimmen, die stabile gemischte Disulfide mit Glutathion bilden, wie etwa Glutaredoxine, besteht darin die oxidierte und reduzierte Form des Proteins zu mischen, woraufhin Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen

stattfinden, bis sich ein Gleichgewicht der beiden Spezies einstellt. Aus diesem Gleichgewicht kann dann das Reduktionspotential bestimmt werden (Aslund *et al.*, 1997). Allerdings ist auch diese Methode für Mia40 nicht anwendbar, da Mia40 stabile, kovalente Homodimere über die Cysteine des aktiven Zentrums bildet.

Da also auch durch Verwendung anderer Redoxpaare als GSH und GSSG kein Reduktionspotential für Mia40 bestimmt werden konnte, wurde versucht aus den mit Glutathion ermittelten Daten verwertbare Ergebnisse zu erhalten. Aus der elektrophoretischen Analyse der Reduktion von Mia40 in Anwesenheit von GSH und GSSG können theoretisch die Stabilitäten des katalytischen Disulfids in Mia40 und des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Glutathion bestimmt werden. Allerdings sind die Laufweiten der einzelnen Spezies nicht klar genug voneinander getrennt um eine densitometrische Auswertung durchzuführen. Um dennoch näherungsweise Werte für diese Reduktionspotentiale zu erhalten, wurde ausgehend von dem in Abbildung 42 a gezeigten Gel die GSH-Konzentration abgeschätzt, bei der sich oxidiertes Mia40 und das gemischte Disulfid mit Glutathion, sowie das gemischte Disulfid mit Glutathion und reduziertes Mia40 im Gleichgewicht befinden. Anhand der so bestimmten Gleichgewichtskonstanten wurde das Reduktionspotential der jeweiligen Mia40-Spezies berechnet. Obwohl die Abweichung dieser Analyse groß ist, können so näherungsweise die Stabilitäten der Disulfide angegeben werden.

Durch die beschriebene Analyse wurde das Reduktionspotential des katalytischen Disulfids in Mia40 zu nahe -160 mV und das Reduktionspotential des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Glutathion zu nahe -210 mV bestimmt. Das Reduktionspotential des gemischten Disulfids liegt in der Nähe des Literaturwerts für Mia40 (-200 mV), was daran liegen könnte, dass dieser Zustand die Fluoreszenzänderung, die von Banci *et al.* als Sonde verwendet wurde, bei der Reduktion von Mia40 durch Glutathion dominiert. Mit -160 mV liegt die Stabilität des katalytischen Disulfids von Mia40 zwischen den Werten, die für DsbA und PDI bestimmt worden waren. Die Stabilisierung, die sich für das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Glutathion ergibt, kann darauf zurückzuführen sein, dass durch die kovalente Bindung zwischen getrennten Peptidketten weniger Spannung in das System eingeführt wird, als durch die Oxidation benachbarter Cysteine im CPC-Motiv. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für das gemischte Disulfid zwischen DsbA_{C33S} und Glutathion gefunden, dessen Reduktionspotential mit -175 mV ebenfalls negativer ist, als das des katalytischen Disulfids (Zapun *et al.*, 1993). Obwohl die gemischten Disulfide von Mia40 und DsbA mit Glutathion stabiler sind, als die katalytischen Disulfide, sind sie instabiler, als die gemischten Disulfide kurzer Peptide mit Glutathion (-240 bis -260 mV) oder intramolekulare Disulfide in Peptiden (-190 bis -215 mV) (Keire *et al.*, 1992; Rabenstein & Weaver, 1996; Rabenstein & Yeo, 1994; Siedler *et al.*, 1993).

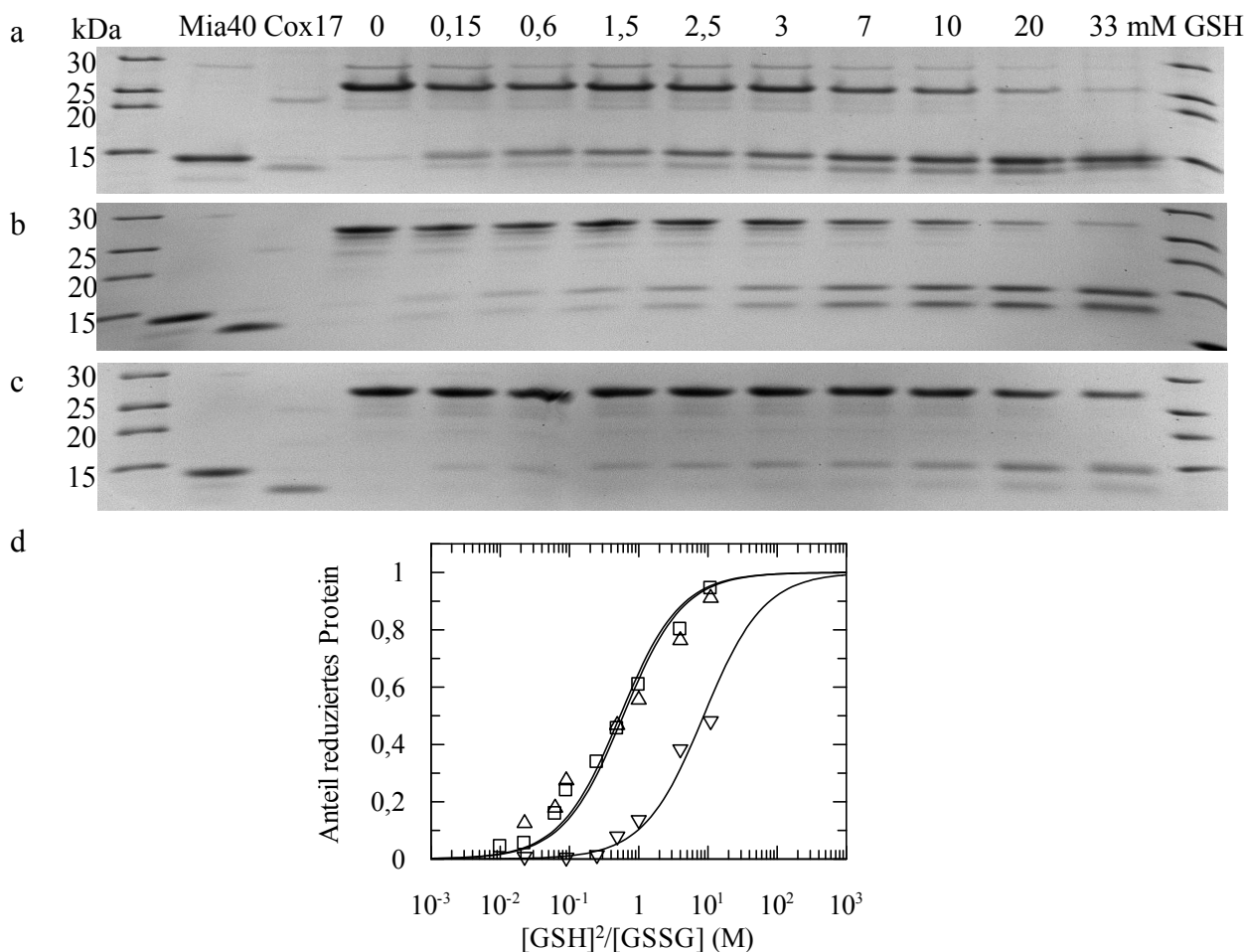


Abbildung 43: Stabilität der gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17* gegenüber Reduktion durch Glutathion. Es wurden je 10 μ M der gemischten Disulfide aus Mia40 und (a) Cox17*_{36C}, (b) Cox17*_{47C} und (c) Cox17*_{57C} mit 0,1 mM GSSG und den angegebenen GSH-Konzentrationen in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C für 6 h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat abgestoppt und die Proben durch nicht reduzierende SDS PAGE analysiert. (d) Die Bandenintensitäten der gemischten Disulfide wurden densitometrisch ausgewertet und für Cox17*_{36C} (\square), Cox17*_{47C} (Δ) und Cox17*_{57C} (∇) gegen die Glutathionkonzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich der Nernst-Gleichung. Die erhaltenen Reduktionspotentiale sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die näherungsweise bestimmten Reduktionspotentiale für Mia40 und das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Glutathion sollten im Weiteren für einen Vergleich mit den Reduktionspotentialen der gemischten Disulfide zwischen Mia40 und Cox17*_{1Cys} herangezogen werden. Um die Reduktionspotentiale dieser gemischten Disulfide zu bestimmen, wurden sie mit einer Mischung aus GSH und GSSG inkubiert und die Reduktion des kovalenten Komplexes zwischen Mia40 und Cox17*_{1Cys} durch SDS-PAGE verfolgt (Abbildung 43). Das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17* ist deutlich stabiler, als das mit Glutathion, das bereits durch 7 mM GSH vollständig reduziert wird. Die höchste Stabilität zeigt dabei das Disulfid mit Cys57, das auch durch 33 mM GSH nicht vollständig reduziert werden konnte. Höhere Konzentrationen an GSH führten wieder zu einer Zunahme der Bande des gemischten Disulfids, eventuell weil in diesem Bereich das Blockieren der freien Cysteine durch Iodacetat nicht mehr effizient war (Abbildung S 19).

Eine Auswertung der Bandenintensitäten der gemischten Disulfide durch die Nernst Gleichung ergab die Reduktionspotentiale der gemischten Disulfide, die zwischen -277 mV für Cys57 und -243 mV für Cys36 liegen (Tabelle 6, Abbildung 43 d). Sie sind damit wesentlich negativer, als das Reduktionspotential von Mia40 mit -160 mV. Die Gleichgewichtskonstante der Reduktion des gemischten Disulfids durch das Redoxpaar GSH/GSSG steigt für das intermolekulare Disulfid zwischen Mia40 und Cox17* auf Werte zwischen 0,6 und 8 M im Vergleich zu 0,0006 M für das katalytische Disulfid in Mia40 im Übergangsmittelpunkt. Dies zeigt, dass die Disulfide mit dem Substrat sehr viel stabiler sind, als das intramolekulare, katalytische Disulfid. Es zeigt auch, dass die Interaktion zwischen Mia40 und dem Substrat für die Stabilität entscheidend ist, da die Stabilisierung durch Glutathion deutlich schwächer ausfällt.

Tabelle 6: Reduktionspotentiale und Stabilitäten von Mia40 und gemischten Disulfiden mit Cox17*

	T_M (°C)	K_{eq}^{ox} (mM)	E^0 (mV)	$\Delta\Delta G_{Red}$ (kJ mol ⁻¹)
Mia40 oxidiert	88 ± 3	0,6	~ -160 -200 ± 5*	
Mia40 reduziert	83 ± 2			
Gem. Disulfid aus Mia40 und				
Glutathion			~ -210	-10
Cox17* _{36C}	96 ± 1	600 ± 300	-243 ± 6	-16
Cox17* _{36C} 37A38A39A	89 ± 1	4,0 ± 0,6	-182 ± 2	-4
Cox17* _{36C} 50A51A	90 ± 3	40 ± 30	-209 ± 10	-9
Cox17* _{47C}	>102	1100 ± 600	-250 ± 6	-17
Cox17* _{57C}	>102	8000 ± 2000	-277 ± 2	-23
Cox17* _{57C} 37A38A39A	100 ± 2	3000 ± 2000	-261 ± 8	-19
Cox17* _{57C} 50A51A	92 ± 1	140 ± 80	-225 ± 7	-13

Die Proben wurden wie unter Abbildung 43 beschrieben vorbereitet und durch Gelelektrophorese analysiert. Die Bandenintensität des gemischten Disulfids wurde gegen das Verhältnis aus reduziertem und oxidiertem Glutathion aufgetragen und die Reduktionspotentiale E^0 über die Nernst-Gleichung bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Reduktionspotentiale für Mia40 und das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Glutathion sind lediglich abgeschätzt. *Der Wert wurde aus (Banci *et al.*, 2009) entnommen. Die Übergangsmittelpunkte der thermischen Denaturierung entsprechen dem Punkt der maximalen Steigung der Ableitungen der Denaturierungskurven, wie in Abbildung 41 b gezeigt. Der angegebene Fehler entspricht einer Abschätzung des Fehlers, der durch die Breite des Peaks der abgeleiteten Kurve bestimmt wird. K_{eq}^{ox} ist die Gleichgewichtskonstante der Reduktion des gemischten Disulfids durch Glutathion, $\Delta\Delta G_{Red}$ gibt die Stabilisierung eines Disulfids gegenüber dem katalytischen Disulfid in Mia40 an.

Der Vergleich der Stabilisierung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17* gegenüber Reduktion durch Glutathion und gegenüber thermischer Denaturierung zeigt, dass beide Prozesse gekoppelt sind. Die kovalente Bindung des Substrats erhöht die konformationelle Stabilität von Mia40, was wiederum die Stabilität des intermolekularen Disulfid erhöht.

3.5.6 Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Mia40 und Cox17* stabilisieren das gemischte Disulfid

Das Reduktionspotential von Disulfiden wird durch die effektive Konzentration der Monothiole bestimmt. Anhand von Berechnungen wurden für niedermolekulare Reduktionsmittel drei Faktoren gefunden, die die effektive Konzentration beeinflussen: Der Diederwinkel der Disulfidbindung, die Winkel der beiden Thiolbindungen und van der Waal's Wechselwirkungen in der direkten Umgebung der Disulfide (Burns & Whitesides, 1990). Insbesondere der letzte Punkt kann für die Wechselwirkung zweier Proteine entscheidend sein, da hier oft günstige Interaktionen komplementärer Flächen auftreten. Bei der Analyse der Interaktion von Mia40 und Cox17* konnten im Rahmen dieser Arbeit die Reste der MISS/ITS-Sequenz (50F51I) als wichtig für die nicht kovalente Komplexbildung und die ILF-Sequenz (37I38L39F) als entscheidend für die schnelle Ausbildung des gemischten Disulfids identifiziert werden (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4). Da diese hydrophoben Aminosäuren die Wechselwirkung mit Mia40 bestimmen, könnten sie auch wichtig sein für die Stabilisierung des kovalenten Intermediats. Daher wurden die gemischten Disulfide von Mia40 und Cox17*_{36C}, sowie Cox17*_{57C} mit den Substitutionen 37A38A39A und 50A51A ebenfalls analysiert.

Es zeigte sich, dass die eingeführten Substitutionen deutliche Einflüsse auf die Stabilität des gemischten Disulfids zwischen Cox17* und Mia40 gegenüber thermischer Denaturierung haben. Alle Mutationen wirken sich destabilisierend aus, wobei Aminosäuren in der Nähe des Disulfids eine stärkere Auswirkung haben. Die Übergangsmittelpunkte der Denaturierungskurven des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und den Cox17*_{36C}-Varianten liegen nun im Bereich von oxidiertem Mia40, d.h. der Beitrag des Substrats zur Stabilität ist aufgehoben (Abbildung 44 a,b, Tabelle 6). Die kovalenten Komplexe aus Mia40 und den Cox17*_{57C}-Varianten sind ebenfalls gegenüber dem Komplex mit Wildtyp-Cox17*_{57C} stark destabilisiert, wobei insbesondere die Substitutionen an den Positionen 50 und 51 zu einem starken Stabilitätsverlust von mindestens 10 °C führen (Abbildung 44 c,d, Tabelle 6). Sind dagegen die Positionen 37-39 verändert, so ist die Wechselwirkung zwischen Mia40 und dem Substrat noch stark genug um zu einem deutlichen Stabilitätsgewinn gegenüber den monomeren Proteinen zu führen.

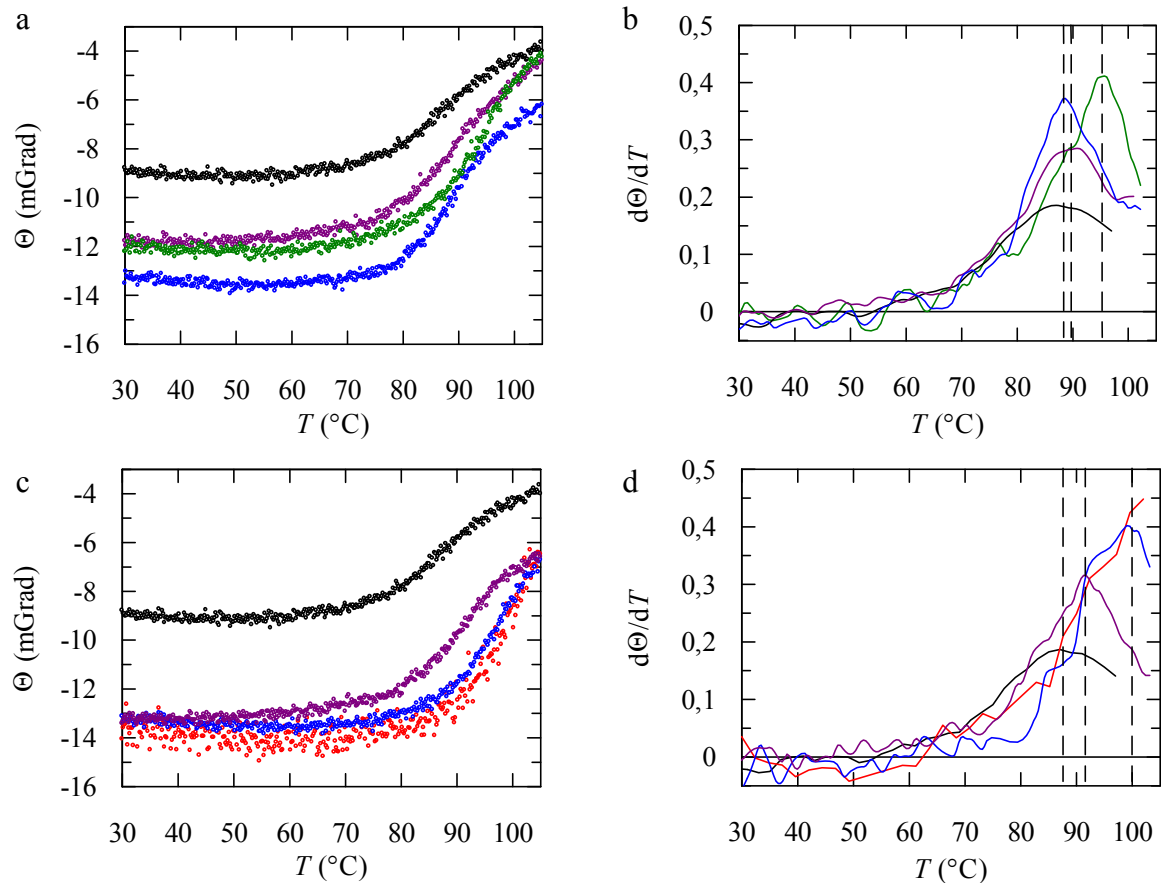


Abbildung 44: Thermische Denaturierung der gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17*. Gezeigt ist die thermische Entfaltung von je 1 μM Protein in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 verfolgt über das CD-Signal bei 222 nm für Mia40 (\circ), sowie die gemischten Disulfide aus Mia40 und (a) Cox17*_{36C} (\circ), Cox17*_{36C}37A38A39A (\circ) und Cox17*_{36C}50A51A (\circ) bzw. aus Mia40 und (c) Cox17*_{57C} (\circ), Cox17*_{57C}37A38A39A (\circ) und Cox17*_{57C}50A51A (\circ). Die Denaturierungskurven wurden abgeleitet und die resultierenden Steigungen der Kurven gegen die Temperatur aufgetragen (b, d). Die durchbrochenen Linien zeigen näherungsweise den Übergangsmittelpunkt. Die abgelesenen T_M -Werte sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Neben der thermischen Stabilität wurde auch das Reduktionspotential der gemischten Disulfide mit den Cox17*-Varianten bestimmt. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede gegenüber den Ausgangsvarianten. Wird im gemischten Disulfid mit Cox17*_{36C} die MISS/ITS-Sequenz gegen Ala ersetzt, so führt dies zu einem Anstieg des Reduktionspotentials um ca. 35 mV auf -210 mV, was ungefähr dem Wert des gemischten Disulfids aus Mia40 und Glutathion entspricht (Abbildung 45 b, Tabelle 6). Dies bedeutet, dass Cox17* ohne die MISS/ITS-Sequenz keine stabilisierenden Wechselwirkungen mit Mia40 eingehen kann. Die Substitution der ILF-Sequenz in direkter Nachbarschaft des gemischten Disulfids mit Cys36 übt einen noch stärkeren Einfluss aus. Sie bewirkt, dass bereits 7 mM GSH ausreichen um das kovalente Intermediat fast vollständig zu reduzieren (Abbildung 45 c). Dies entspricht einem Anstieg des Reduktionspotentials auf -182 mV, was bedeutet, dass dieses intermolekulare Disulfid sogar weniger stabil ist, als das mit Glutathion (Tabelle 6).

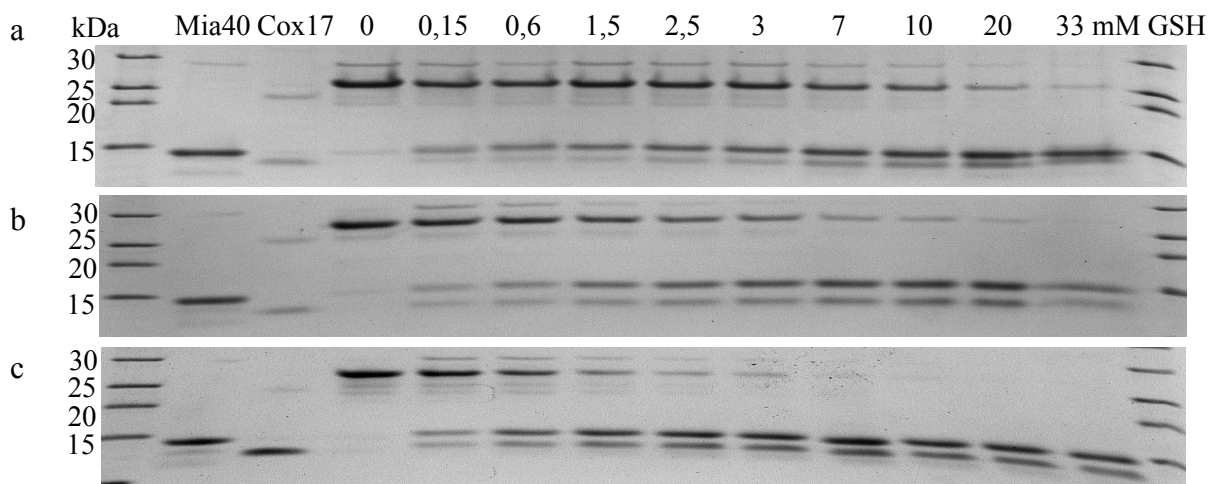


Abbildung 45: Stabilität der gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17*-Varianten gegenüber Reduktion durch Glutathion. Es wurden je 10 μ M der gemischten Disulfide aus Mia40 und (a) Cox17*_{36C}, (b) Cox17*_{36C50A51A} und (c) Cox17*_{36C37A38A39A} mit 0,1 mM GSSG und den angegebenen GSH-Konzentrationen in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C für 6 h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat abgestoppt und die Proben durch nicht reduzierende SDS PAGE analysiert. Die densitometrische Auswertung ist in Abbildung 46 d gezeigt.

Bildet Cys57 in Cox17* das gemischte Disulfid mit Mia40, so ändert sich der relative Einfluss der Substitutionen auf das Reduktionspotential. Hier ist der destabilisierende Effekt des Austausches der MISS/ITS-Sequenz deutlich größer, als der der ILF-Sequenz (Abbildung 46). Die Substitution der ILF-Sequenz durch Ala führt zu einer leichten Erhöhung des Reduktionspotentials auf -260 mV, womit dieses Disulfid nach wie vor stabiler ist, als die gemischten Disulfide mit den anderen Cysteinen aus Cox17* (Abbildung 46 c, Tabelle 6). Dies stimmt gut mit den Ergebnissen der thermischen Denaturierung der Proteine überein. Hier hatte sich gezeigt, dass das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17*_{36C37A38A39A} mit einem T_M -Wert nahe 100 °C immer noch extrem stabil ist (Tabelle 6). Die Substitution der MISS/ITS-Sequenz beeinflusst das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cox17*_{57C} deutlich stärker. Sowohl die Stabilität gegenüber Reduktion, als auch gegenüber thermischer Denaturierung ist deutlich verringert (Abbildung 46 b, Tabelle 6).

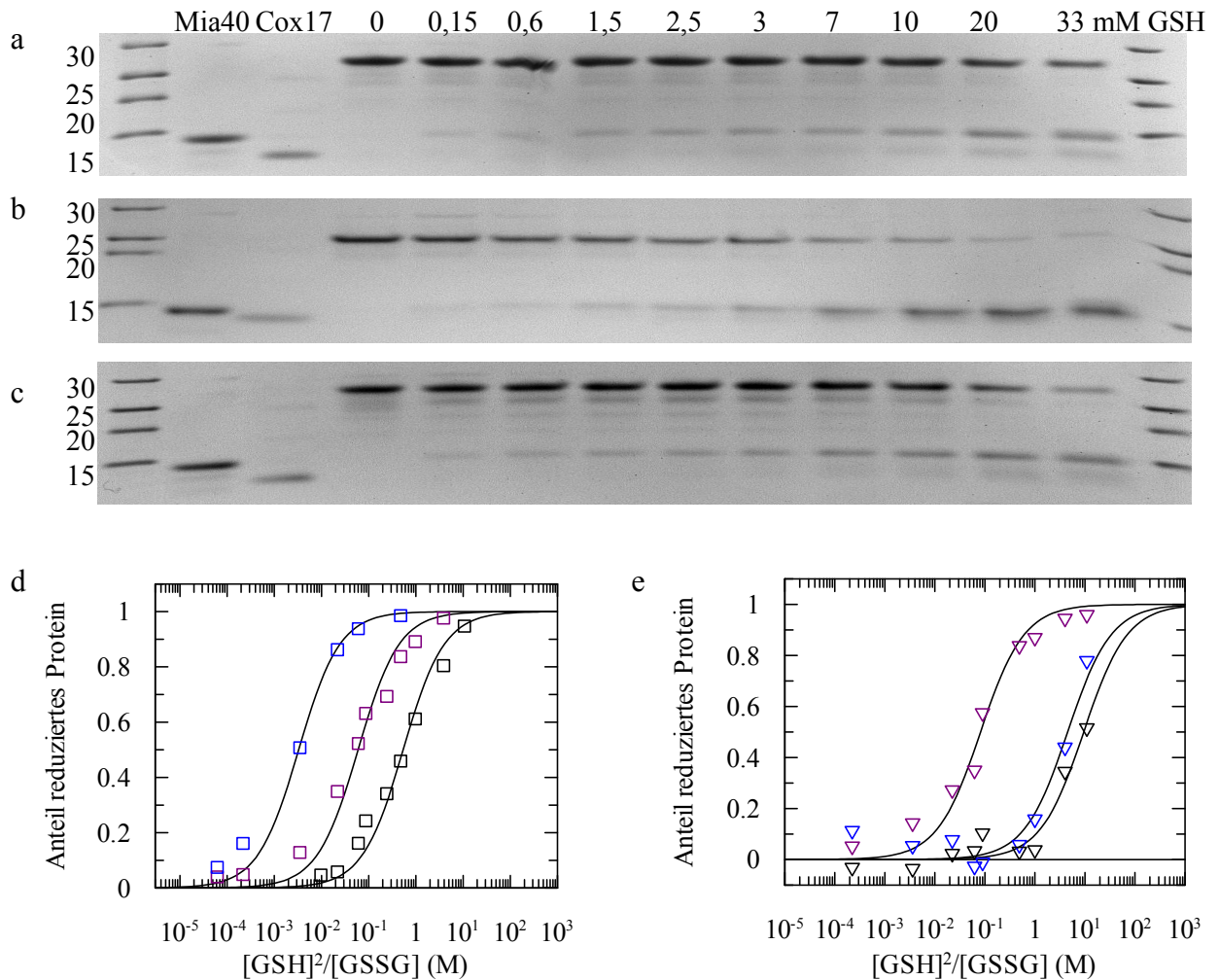


Abbildung 46: Stabilität der gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17*-Varianten gegenüber Reduktion durch Glutathion. Es wurden je 10 μ M der gemischten Disulfide aus Mia40 und (a) Cox17*_{57C}, (b) Cox17*_{57C}50A51A und (c) Cox17*_{57C}37A38A39A mit 0,1 mM GSSG und den angegebenen GSH-Konzentrationen in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C für 6 h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat abgestoppt und die Proben durch nicht reduzierende SDS PAGE analysiert. Es wurden die Bandenintensitäten der gemischten Disulfide zwischen Mia40 und (d) Cox17*_{36C} (\square), Cox17*_{36C} 37A38A39A (\square), Cox17*_{36C}50A51A (\square) aus Abbildung 45 und (e) Cox17*_{57C} (∇), Cox17*_{57C}37A38A39A (∇) und Cox17*_{57C}50A51A (∇) aus Teilabbildung a-c, densitometrisch ausgewertet und gegen die Glutathionkonzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich der Nernst-Gleichung. Die erhaltenen Reduktionspotentiale sind in Tabelle 6 zusammengefasst..

Die Untersuchung der gemischten Disulfide zwischen Mia40 und Cox17*-Varianten hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber thermischer Entfaltung und ihres Reduktionspotentials ermöglicht es, einen Zusammenhang zwischen der konformationellen Stabilität und den intermolekularen Disulfiden herzustellen. Aus der Auftragung des Reduktionspotentials gegen den T_M -Wert ergibt sich ein linearer Zusammenhang der beiden Stabilitätsparameter (Abbildung 47). Je niedriger das Reduktionspotential ist, d.h. je größer die Stabilität des Disulfids, desto größer ist auch die konformationelle Stabilität. Die kovalente Bindung des Substrats stabilisiert die gefaltete und damit bindungskompetente Form von Mia40, was

wiederum dazu führt, dass die hydrophobe Bindungsfurche des Enzym stabil bleibt und das gemischte Disulfid durch die hydrophobe Umgebung geschützt wird.

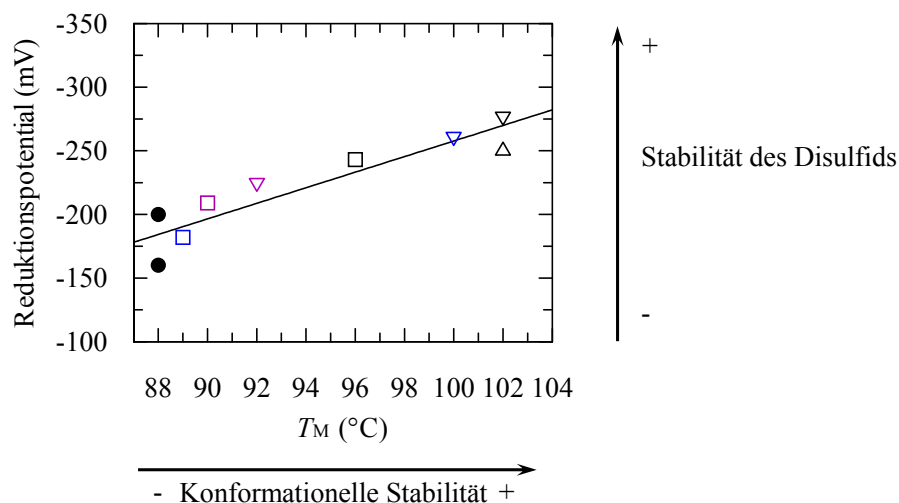


Abbildung 47: Korrelation von konformationeller Stabilität und Reduktionspotential. Es wurde das Reduktionspotential gegen den T_M -Wert für Mia40 (●) und die gemischten Disulfide zwischen Mia40 und Cox17*_{36C} (□), Cox17*_{36C} 37A38A39A (□), Cox17*_{36C} 50A51A (□), Cox17*_{47C} (Δ), Cox17*_{57C} (▽), Cox17*_{57C} 37A38A39A (▽) und Cox17*_{57C} 50A51A (▽) aufgetragen. Die durchgezogene Linie deutet den linearen Zusammenhang an.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Stabilisierung des gemischten Disulfids durch günstige, vermutlich hydrophobe, Wechselwirkung der beiden Partner Mia40 und Cox17* hervorgerufen wird. Um dies weiter zu untersuchen, wurde die Stabilität des gemischten Disulfids gegenüber Reduktion durch Glutathion in Anwesenheit von 3 M Harnstoff beispielhaft anhand von Cox17*_{36C} und den Varianten Cox17*_{36C} 37A38A39A bzw. Cox17*_{36C} 50A51A untersucht. Das Denaturierungsmittel Harnstoff schwächt hydrophobe Interaktionen und hebt damit die stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen Mia40 und Cox17* im gemischten Disulfid auf. Dies könnte dazu führen, dass die Unterschiede der Reduktionspotentiale der gemischten Disulfide zwischen Mia40 und den Cox17*-Varianten verringert werden, da die günstigen Wechselwirkungen gestört werden. Mia40 selbst ist extrem stabil und in 3 M Harnstoff noch vollständig gefaltet. Abbildung 48 zeigt, dass in Gegenwart von 3 M Harnstoff die Unterschiede in der Stabilität der gemischten Disulfide zwischen Mia40 und den drei Cox17*_{36C}-Varianten praktisch verschwunden sind. Nach der Schwächung der hydrophoben Interaktionen durch Harnstoff werden sie in gleicher Weise durch GSH reduziert. Die genauen Reduktionspotentiale konnten nicht ermittelt werden, da die Datenpunkte für niedrige GSH-Konzentrationen deutlich vom symmetrischen Kurvenverlauf abweichen (Abbildung 48 d). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Harnstoff sich unterschiedlich auf die Oxidations- bzw. Reduktionskraft von GSH und GSSG auswirkt. Dies konnte aber nicht abschließend geklärt werden.

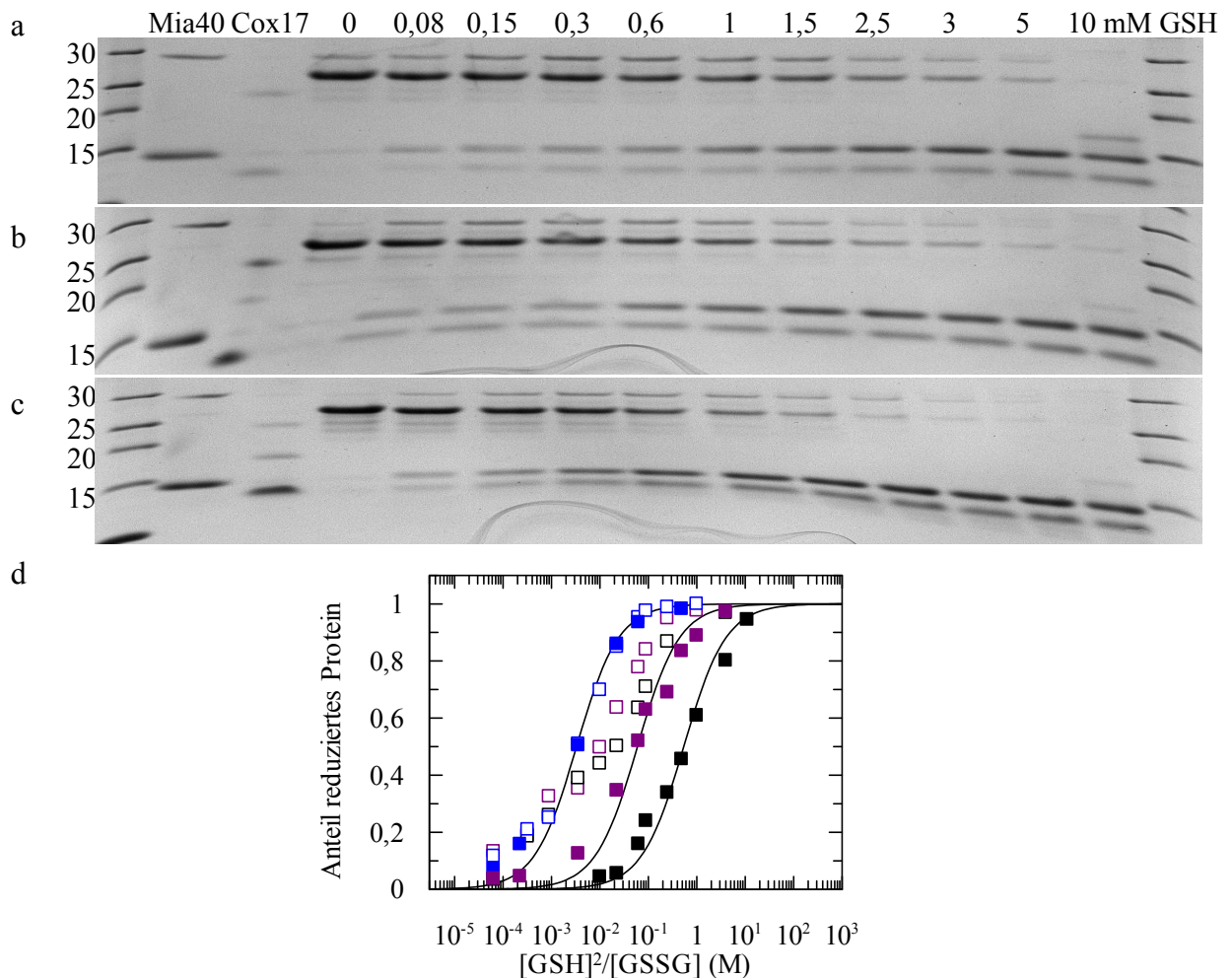


Abbildung 48: Stabilität der gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17* gegenüber Reduktion durch Glutathion in Anwesenheit von Denaturierungsmittel. Es wurden je 10 μM der gemischten Disulfide aus Mia40 und (a) Cox17*_{36C}, (b) Cox17*_{36C}50A51A und (c) Cox17*_{36C}37A38A39A mit 0,1 mM GSSG und den angegebenen GSH-Konzentrationen in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, 3 M Harnstoff bei 15 °C für 6 h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat abgestoppt und die Proben durch nicht reduzierende SDS PAGE analysiert. (d) Es wurden die Bandenintensitäten der gemischten Disulfide aus den Teilabbildungen a-c densitometrisch ausgewertet und für Cox17*_{36C} (\square), Cox17*_{36C}37A38A39A (\square) und Cox17*_{36C}50A51A (\square) aufgetragen. Die ausgefüllten Symbole entsprechen den Werten in Abwesenheit von Harnstoff und wurden Abbildung 45 entnommen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Anstieg durch die Nernst-Gleichung.

3.5.7 Cox17* ist im gemischten Disulfid mit Mia40 entfaltet

Die Stabilität des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17* wird durch die Hydrophobizität seiner unmittelbare Umgebung bestimmt. Die direkt benachbarte ILF-Sequenz an den Positionen 37-39 stabilisiert das gemischte Disulfid mit Cys36, während die MISS/ITS-Sequenz (Position 50 und 51) wichtig für die Stabilität der kovalenten Bindung von Cys57 zu Mia40 ist. Die stabilisierenden Reste sind jeweils sehr hydrophob und begünstigen damit die Cystin-Form gegenüber dem polareren Cystein. Da das gemischte Disulfid hierdurch stabilisiert wird und weniger leicht zu reduzieren ist, wird das Reduktionspotential stärker negativ. Entsprechend führt der Austausch der stabilisierenden

hydrophoben Aminosäuren zu einem Anstieg des Reduktionspotentials, da das gemischte Disulfid nun leichter reduziert werden kann. Damit kann der Einfluss der ILF- und MISS/ITS-Sequenz auf die Reduktionspotentiale durch direkte Wechselwirkung der hydrophoben Aminosäuren mit dem Disulfid erklärt werden.

Die NMR-Struktur eines gemischten Disulfids aus humanem Mia40 und Cox17 zeigt, dass die Reste 48-62 des Substrats bei Bindung an die hydrophobe Furche des Enzyms eine Helix ausbilden (Banci *et al.*, 2010). Es wäre möglich, dass die Ausbildung dieser Helix durch günstige Wechselwirkungen zwischen Mia40 und Cox17 das gemischte Disulfid stabilisiert. Daher sollte nun untersucht werden ob sich die Cox17*-Varianten, die zu unterschiedlichen Reduktionspotentialen der gemischten Disulfide mit Mia40 führen, in der Ausbildung von Sekundärstrukturelementen bei Bindung an Mia40 unterscheiden. Es wurden CD-Spektren der gemischten Disulfide, sowie von Cox17* bzw. Mia40 aufgenommen, um eventuell entstehende Helix-Strukturen zu identifizieren (Abbildung 49). Helices zeigen ein sehr starkes CD-Signal und sollten daher klar sichtbar sein.

Das CD-Signal von Mia40 ist hauptsächlich durch helikale Anteile geprägt, wohingegen Cox17*_{36C} und die Varianten weitgehend entfaltet vorliegen (Abbildung 49 a,c,d). Das gemischte Disulfid aus Mia40 und Cox17*_{36C} zeigt sowohl bei den Helix-Minima bei 222 nm und 208 nm, als auch im positiven Bereich um 190 nm ein stärkeres Signal, als Mia40 alleine. Zum Vergleich wurde die Summe der Einzelspektren von Mia40 und Cox17*_{36C} gebildet. Das resultierende Spektrum weicht besonders in den Bereichen um 208 nm und 190 nm von dem des gemischten Disulfids ab, was dafür sprechen würde, dass sich bei Komplexbildung tatsächliche zusätzliche Strukturelemente ausbilden. Um zu überprüfen ob die kovalente Bindung hierfür nötig ist, wurde ein Spektrum einer Mischung aus Mia40_{C296SC298S} und Cox17*_{36C} gemessen. In diesem Fall können die beiden Proteine nur den nicht kovalenten Komplex ausbilden. Das gemessene Spektrum ist deckungsgleich zur Summe der Einzelspektren, was zeigt, dass nur durch Bildung des gemischten Disulfids Struktur induziert wird. Durch Bildung der Differenz der Spektren aus gemischtem Disulfid und Mia40 bzw. Mia40_{C296SC298S} kann die Struktur von Cox17* im gebundenen Zustand erhalten werden (Abbildung 49 b,d,f). Der Vergleich mit dem Spektrum von isoliertem Cox17* zeigt, dass die Abweichung hauptsächlich im positiven Bereich bei 190 nm liegt und das Minimum zu größeren Wellenlängen verschoben ist. Im Bereich von 222 nm, der indikativ für Helices ist, sind die Spektren jedoch gleich, was gegen die Ausbildung einer zusätzlichen Helix im Substrat spricht. Vermutlich sind die Unterschiede der Spektren eher durch eine Reduktion der Flexibilität der gebundenen Proteinkette, als durch Ausbildung fester Sekundärstrukturelemente zu erklären. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Cox17*-Varianten, der die stark unterschiedlichen Reduktionspotentiale erklären würde, konnte nicht gefunden werden.

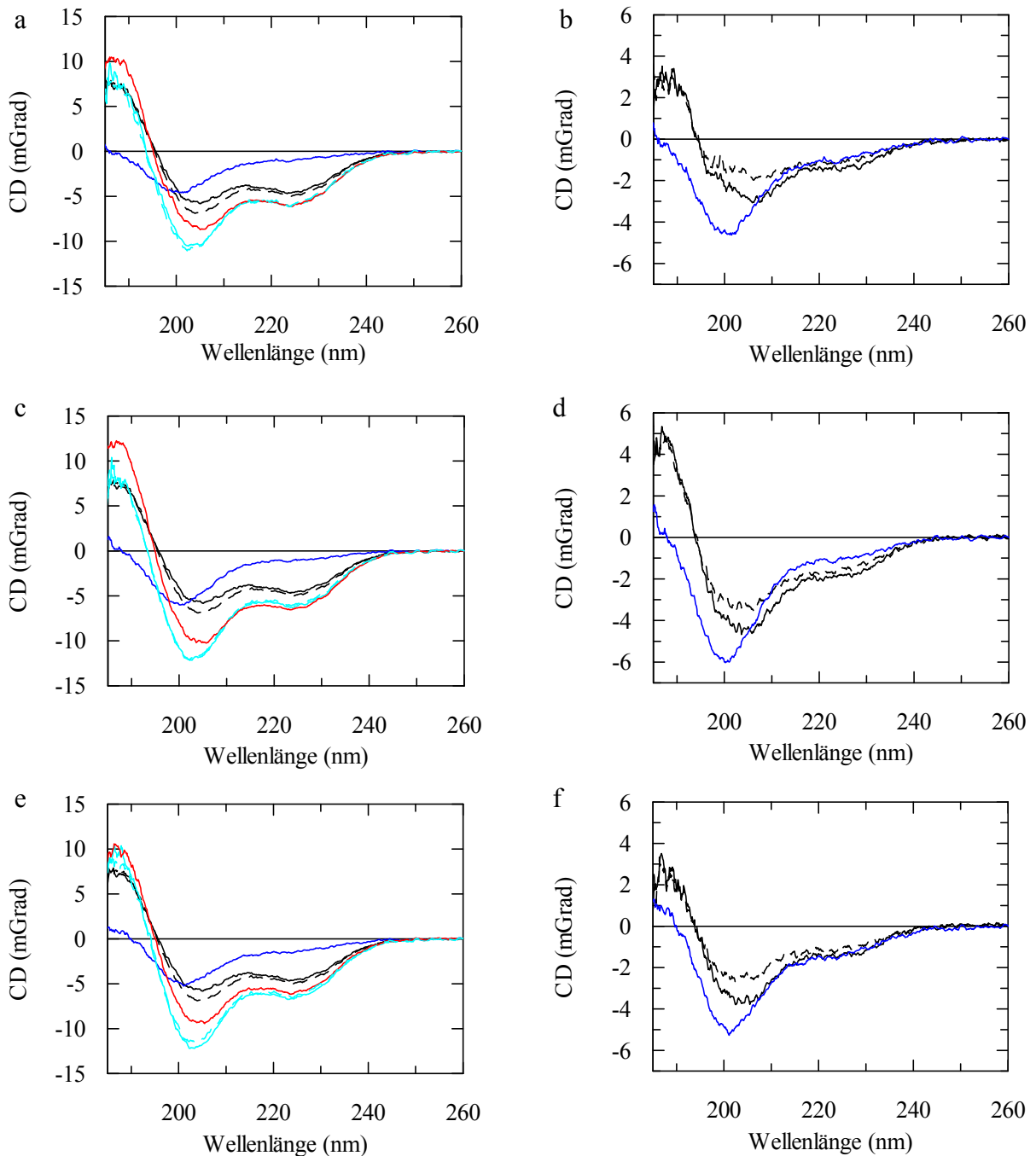


Abbildung 49: Sekundärstruktur des gemischten Disulfids aus Mia40 und Cox17*. Gezeigt sind die CD-Spektren von je 4 μM (a,c,e) Mia40 (—), Mia40_{C296SC298S} (---), sowie zusätzlich von (a) Cox17*_{36C} (—), dem gemischten Disulfid aus Mia40 und Cox17*_{36C} (—), einer Mischung aus Mia40_{C296SC298S} und Cox17*_{36C} (—) und der berechneten Summe der Einzelspektren aus Mia40 und Cox17*_{36C} (---). In Teilabbildung (c) und (e) sind die entsprechenden Spektren dargestellt, wobei statt Cox17*_{36C} Cox17*_{36C}37A38A39A (c) bzw. Cox17*_{36C}50A51A (e) verwendet wurde. Zusätzlich gezeigt sind die Differenzspektren von (b) dem gemischten Disulfid aus Cox17*_{36C} und Mia40 (—) bzw. Mia40_{C296SC298S} (---) und als Vergleich das Spektrum von Cox17*_{36C} (—). Die Darstellung in d und f ist analog zu b, wobei statt Cox17*_{36C} Cox17*_{36C}37A38A39A (d) bzw. Cox17*_{36C}50A51A (f) verwendet wurde. Alle Messungen wurden in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt.

Durch die hier durchgeführten Analysen der gemischten Disulfide zwischen Mia40 und dem Substratprotein Cox17* konnten die molekularen Grundlagen für die extreme Langlebigkeit

des gemischten Disulfids aufgeklärt werden. Der Zustand des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und einem Substratprotein ist thermodynamisch stark begünstigt. Die spezifischen Wechselwirkungen beider Proteine über hydrophobe Aminosäuren führen dazu, dass die Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung von Mia40 im Vergleich zum isolierten Protein deutlich erhöht wird. Auch die Stabilität gegenüber Reduktion ist für die intermolekularen Disulfide zwischen Mia40 und Cox17* wesentlich höher, als für das katalytische Disulfid in Mia40. Dies hat zur Folge, dass sich in Anwesenheit eines Substrats immer ein großer Anteil an gemischtem Disulfid mit Mia40 ausbildet. Die Auflösung dieses gemischten Disulfids ist jedoch weniger stark begünstigt und erfolgt nur dann mit guter Effizienz, wenn dieser Prozess durch Ausbildung stabiler intramolekularer Disulfide im Substrat angetrieben wird. Dies bedeutet, dass die energetische Triebkraft der Oxidation von Cox17* durch Mia40 vom Substrat selbst kommt und das Erreichen des nativen Faltungszustands die Freisetzung des korrekt oxidierten Substrats aus dem Komplex mit Mia40 steuert.

4 Zusammenfassende Diskussion

Der Intermembranraum von Mitochondrien (IMS) wurde lange Zeit als reduzierende Umgebung angesehen. Die äußere Mitochondrienmembran enthält Porine, durch die Glutathion aus dem Cytosol frei diffundieren kann und daher wurde angenommen, dass sich im IMS das gleiche reduzierende Milieu einstellt, wie im Cytosol. Dennoch wurden zunehmend disulfidhaltige Proteine im IMS entdeckt und schließlich konnte mit Mia40 ein Enzym identifiziert werden, das die oxidative Faltung von Proteinen in Mitochondrien katalysiert (Chacinska *et al.*, 2004; Mesecke *et al.*, 2005; Naoe *et al.*, 2004; Terziyska *et al.*, 2005). Mia40 ist eine neuartige Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase, die sich in Struktur und Mechanismus erheblich von den bisher bekannten Thioredoxin-ähnlichen Enzymen unterscheidet. Obwohl der Intermembranraum von Mitochondrien topologisch dem bakteriellen Periplasma entspricht, hat sich in diesem Kompartiment ein Oxidationssystem entwickelt, das nicht mit dem prokaryotischen Dsb-System verwandt ist.

In dieser Arbeit wurde die Oxidation des natürlichen Substrats Cox17 durch Mia40 auf molekularer Ebene untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse helfen, den Mechanismus der Substratoxidation besser zu verstehen und erweitern das Verständnis der biologischen Funktion von Mia40.

4.1 Der Faltungszustand der Substrate bestimmt die Bindungsaffinität zu Mia40

Mia40 besitzt im Gegensatz zu den Thioredoxin-ähnlichen Oxidoreduktasen keine separate Substratbindungsdomäne. Dafür bilden hoch konservierte, hydrophobe Aminosäuren eine flache Substratbindungsfurche in direkter Nachbarschaft des katalytischen Disulfids (Banci *et al.*, 2009). Mia40 bindet reduziertes, entfaltetes Cox17 mit einem K_D im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Bindung ist sehr dynamisch und der Komplex hat eine mittlere Lebensdauer von lediglich 10-100 ms. Dies erlaubt einerseits der gebundenen Polypeptidkette verschiedene Bindungsmodi durch schnelle Dissoziation und Reassoziierung zu durchlaufen, bis die optimale Position erreicht ist. Zum anderen wird so eine dauerhafte Blockade von Mia40 durch permanent entfaltete, oder beschädigte Proteine im IMS verhindert. Die MISS/ITS-Sequenz, die anhand von Importexperimenten mit isolierten Mitochondrien als wichtiger Bereich für die Interaktion zwischen Cox17 und Mia40 identifiziert wurde (Sideris *et al.*, 2009), spielt eine wichtige Rolle bei der nicht kovalenten Assoziation. Da diese Sequenz aus drei hydrophoben Aminosäuren besteht, vermittelt sie die Wechselwirkung zwischen dem entfalteten Substrat und der Substratbindungsfurche von Mia40. Oxidiertes Cox17 interagiert nicht mehr mit Mia40, da es nativ gefaltet und die MISS/ITS-Sequenz nicht mehr zugänglich ist.

Die Bindung von Proteinen an Mia40 beschränkt sich nicht auf natürliche Substrate aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Auch das nicht verwandte, permanent entfaltete Protein

RCM- α -Lactalbumin bindet an Mia40. Es ist vielmehr entscheidend, dass die Proteine entfaltet vorliegen und die dadurch exponierten hydrophoben Aminosäuren mit den hydrophoben Bereichen in Mia40 wechselwirken können. Die unspezifische Bindung entfalteter Polypeptidketten erlaubt es Mia40 mit einer Vielzahl von Proteinen zu interagieren, die keine Sequenz- oder Strukturähnlichkeit aufweisen müssen und führt so zu einem breiteren Substratspektrum des Enzyms.

4.2 Mia40 reagiert spezifisch mit Cysteinen in hydrophober Umgebung

Die CX₃C- bzw. CX₉C-Substrate von Mia40 enthalten jeweils vier Cysteine, die zwei strukturelle Disulfide ausbilden (Longen *et al.*, 2009). In Cox17 unterscheiden sich die apparenten Raten der Ausbildung des gemischten Disulfids dieser Cysteine mit Mia40 400-fach. Der entscheidende Faktor, der zur Aktivierung eines bestimmten Cysteins des Substrats im Enzym-Substrat-Komplex führt, ist die Orientierung dieses Cysteins zum katalytischen Disulfid von Mia40. Hierbei spielt zum einen der Abstand zwischen den reagierenden Gruppen eine Rolle, zum anderen die genaue Ausrichtung zueinander. Die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion ist eine bimolekulare, nukleophile Substitutionsreaktion (S_N2). Während der Reaktion tritt ein linearer Übergangszustand auf, dessen Geometrie die Kinetik der Reaktion beeinflusst (Jensen *et al.*, 2009). Cysteine, die beispielsweise durch die umgebende Proteinstruktur schlecht einen solchen linearen Zustand einnehmen können, sind weniger reaktiv.

In Mia40 liegen die hydrophobe Bindungsfurche und das katalytische Disulfid unmittelbar nebeneinander. Eine komplementäre hydrophobe Fläche im reduzierten Substrat ist wichtig für die Ausbildung des nicht kovalenten Komplexes, der ausschließlich über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die ILF-Sequenz in Cox17, die aus drei hydrophoben Resten (Ile37, Leu38, Phe39) in direkter Nachbarschaft zu Cystein36 besteht. Sie dirigiert dieses Cystein in die Nähe des aktiven Zentrums und sorgt so für die extreme Beschleunigung der Ausbildung des gemischten Disulfids. Cys26 ist in Wildtyp-Cox17 extrem unreaktiv, die Reaktivität kann jedoch durch Einführen der ILF-Sequenz in direkter Nachbarschaft von Cys26 fast auf den Wert von Cys36 verbessert werden.

4.3 Die gemischten Disulfide mit Mia40 werden durch hydrophobe Interaktionen stabilisiert

Gemischte Disulfide mit Oxidoreduktasen können im Allgemeinen nicht charakterisiert werden. Die intramolekularen Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen sind in der Regel sehr schnell und daher akkumuliert das gemischte Disulfid nicht, sondern reagiert sofort unter Bildung eines Disulfids im Substrat weiter. Mia40 bildet eine Ausnahme bezüglich der Stabilität der gemischten Disulfide mit den Substraten. Diese sind extrem langlebig und können sowohl *in vitro* populiert, als auch aus Zellen isoliert werden. Die Bildung dieser

Disulfide ist sehr schnell, ihre Auflösung unter Freisetzung des oxidierten Substrats jedoch langsam. Dies ermöglichte es, die gemischten Disulfide zwischen Mia40 und Cox17 eingehend zu untersuchen.

Die molekulare Grundlage für die ungewöhnliche Langlebigkeit des kovalenten Komplexes war bisher unbekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass die Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, die zur Auflösung des gemischten Disulfids führen, durch Veränderung der pK-Werte der beteiligten Cysteine stark verlangsamt sind. Eine Erhöhung der pK-Werte würde die Reaktivität der Cysteine verringern und so verhindern, dass beispielsweise das verbleibende katalytische Cystein in Mia40 das gemischte Disulfid in einer unproduktiven Reaktion auflöst. In PDI verändern sich die pK-Werte der katalytischen Cysteine während der Katalyse, da sich die chemische Umgebung der Thiole durch Umlagerungen der Struktur verändert. Dies ermöglicht es PDI zwischen der Oxidase- und der Isomerasefunktion umzuschalten (Lappi *et al.*, 2004). Die pK-Werte der katalytischen Cysteine von Mia40 sind, im Gegensatz zu den stark erniedrigten Werten der N-terminalen katalytischen Cysteine in DsbA und PDI, im Vergleich zu den Werten freier Cysteine kaum verschoben und im gemischten Disulfid mit Cox17 gegenüber dem isolierten Protein nahezu unverändert.

Während die Reaktivität des verbleibenden freien Cysteins von Mia40 im gemischten Disulfid also nicht für die Langlebigkeit dieses Zustands verantwortlich ist, leisten die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Mia40 und Cox17 einen großen Beitrag hierzu. Mia40 ist gegenüber thermischer Denaturierung mit einem Übergangsmittelpunkt von ca. 88 °C extrem stabil. Die Reduktion des katalytischen Disulfids führt zu einer leichten Destabilisierung des Proteins. Der kovalente Komplex zwischen Mia40 und Cox17 stellt hingegen einen energetisch günstigeren Zustand dar und ist stabiler als oxidiertes und reduziertes Mia40. Dies erklärt, warum die Auflösung des gemischten Disulfids zum instabileren, reduzierten Mia40 hin ungünstig ist.

Das Reduktionspotential gibt die Elektronenaffinität und damit die Stabilität eines Disulfids an. Je positiver das Reduktionspotential, desto größer ist die Elektronenaffinität und desto instabiler das Disulfid. DsbA weist mit -120 mV das positivste Reduktionspotential aller Oxidoreduktasen auf (Inaba & Ito, 2002). Das Reduktionspotential des katalytischen Disulfids von Mia40 beträgt -160 mV und deutet damit ebenfalls auf ein eher instabiles Disulfid hin. Die gemischten Disulfide mit dem Substrat besitzen hingegen deutlich negativere Reduktionspotentiale und sind damit auch wesentlich stabiler. Das gemischte Disulfid zwischen Mia40 und Cys57 aus Cox17 zeigt ein Reduktionspotential von -277 mV und ist somit um 23 kJ/mol gegenüber dem katalytischen Disulfid in Mia40 stabilisiert. Die hohe Stabilität der gemischten Disulfide gegenüber Reduktion korreliert mit der konformationellen Stabilität und ist der Grund für die Langlebigkeit der kovalenten Intermediate zwischen Mia40 und Cox17.

Die Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Aminosäuren in Mia40 und Cox17 stabilisieren das gemischte Disulfid. Diese Kontakte erfolgen in direkter Umgebung des

intermolekularen Disulfids zwischen Cox17 und Mia40. Die hydrophobe Umgebung des Disulfids bevorzugt den unpolaren oxidierten Zustand gegenüber dem polareren Dithiol und wirkt dadurch stabilisierend.

4.4 Die konformationelle Faltung des Substrats und die kinetische Kontrolle von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen steuern die oxidative Faltung durch Mia40

Das gemischte Disulfid zwischen Cox17 und Mia40 wird unter Freisetzung des oxidierten Substrats aufgelöst. Um Cox17 vollständig zu oxidieren müssen zwei Disulfide gebildet werden. Die Bildung des inneren Disulfids ist schnell, während die Bildung des äußeren Disulfids der langsame, geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse ist. Die Reihenfolge der Disulfidbildung durch Mia40 wird durch kinetische Kontrolle der Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen gesteuert.

Im nicht kovalenten Komplex zwischen Mia40 und Cox17 wird das gemischte Disulfid präferenziell mit Cys36 aus Cox17 gebildet, da diese Reaktion extrem schnell ist. Die Auflösung des gemischten Disulfids kann durch nukleophilen Angriff eines der drei verbliebenen Cysteine des Substrats an Cys36 erfolgen. Hierdurch würde sich mit Cys47 das native, innere Disulfid, mit Cys26 und Cys57 hingegen jeweils ein nicht natives Disulfid bilden. Der Angriff von Cys57 am gemischten Disulfid findet nicht statt, möglicherweise weil die beiden reagierenden Cysteine des Substrats zu weit voneinander entfernt sind. Das nicht native Disulfid zwischen Cys26 und Cys36 wird zwar gebildet, allerdings sehr langsam. Die Bildung des nativen Disulfids durch Angriff von Cys47 am gemischten Disulfid mit Mia40 ist dagegen sehr schnell. Daher ist diese Reaktion deutlich begünstigt und es wird hauptsächlich Cox17 mit der oxidierten, inneren Disulfidbrücke freigesetzt.

Diese teiloxidierte Spezies ist noch weitgehend entfaltet und die MISS/ITS-Sequenz weiterhin zugänglich. Daher kann das teiloxidierte Substrat erneut an die Substratbindungsfurche in Mia40 binden und die zweite Disulfidbrücke (Cys26-Cys57) gebildet werden. Die Freisetzung des nativ gefalteten, oxidierten Substrats stellt den finalen, irreversiblen Schritt der Katalyse dar. Durch das Erreichen des nativen Faltungszustandes werden hydrophobe Reste und die strukturellen Disulfide des Substrats im Innern des Proteins verborgen, so dass keine weitere Interaktion mit Mia40 möglich ist. Die konformationelle Faltung des Substrats liefert demnach die Triebkraft für die Oxidation durch Mia40. Wie alle anderen Faltungshelfer besitzt auch Mia40 keine Information über den richtigen Faltungszustand der Substrate. Dieser ist vielmehr in der Struktur des Substrats kodiert, da korrekt gefaltete Proteine dem Katalysegleichgewicht entzogen werden.

Die räumliche Nähe zwischen der hydrophoben Bindungsfläche und dem katalytischen Disulfid ermöglicht es Mia40 im Substrat Cysteine in hydrophober Umgebung zu selektieren. Diese bilden oft Disulfide, die im Inneren des Proteins vergraben sind und daher früh gebildet werden sollten, um den Faltungsweg nicht zu blockieren. Die Proteine der CX₉C-Substratfamilie von Mia40 sind strukturell untereinander eng verwandt, da sie, genau wie

Cox17, eine Helix-Schleife-Helix-Struktur einnehmen, die durch zwei Disulfide stabilisiert wird. Eine Sequenzanalyse von 13 dieser Proteine ergab, dass die Cysteine, die das innere Disulfid bilden, gehäuft in einer hydrophoben Umgebung liegen. Es könnte also ein allgemeines Prinzip sein, dass Disulfide, die im nativen Protein schlecht zugänglich sind, zuerst durch Mia40 eingeführt werden, damit die entstehenden teilgefalteten Substrate in einer nachfolgenden Reaktion durch Mia40 weiter oxidiert werden können.

4.5 Mia40 ist eine Disulfidisomerase

Es war bisher ungeklärt, ob Mia40 neben der Thioloxygenase- auch eine Disulfidisomerasefunktion besitzt. Die gängige Annahme war, dass die strukturell einfach aufgebauten CX₃C- und CX₉C-Substrate bei Bindung an Mia40 früh helikale Strukturen ausbilden und diese ein Gerüst vorgeben, das die korrekte Disulfidverbrückung sterisch begünstigt. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass Mia40 tatsächlich Mechanismen besitzt, durch die präferenziell die nativen Disulfide in Cox17 gebildet werden. Die Bildung nicht nativer Disulfide ist deutlich langsamer, als die Bildung korrekter Verbrückungen. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass als Nebenprodukt der Oxidation auch ein geringer Anteil falsch verbrückter Spezies entsteht.

Fehlverbrücktes Cox17 kann durch reduziertes Mia40 in den nativen Zustand überführt werden, was beweist, dass das Enzym im Gegensatz zu reinen Thioloxygenasen, wie DsbA, auch Isomerasefunktion besitzt. Allerdings ist die Isomerisierungseffizienz eher gering. Für die Oxidation der einfach aufgebauten CX₃C- und CX₉C-Substrate mit je zwei Disulfiden ist eine Isomerisierungsreaktion möglicherweise für die korrekte oxidative Faltung nicht unbedingt nötig. Es werden jedoch zunehmend Substrate von Mia40 entdeckt, die nicht zu diesen beiden Substratfamilien gehören. Sie weisen eine komplexere Tertiärstruktur auf und enthalten, wie im Fall von Atp23, bis zu 10 Cysteine (Weckbecker *et al.*, 2012). Es ist unwahrscheinlich, dass die Oxidation dieser komplexen Verbrückungen immer korrekt abläuft und ohne nachträgliche Isomerisierung der native Zustand erreicht wird. Daher ist die Isomerasefunktion für die oxidative Faltung komplexer IMS-Proteine *in vivo* vermutlich von Bedeutung.

4.6 Modell für die Oxidation von Cox17 durch Mia40

Die oxidative Faltung von Proteinen durch Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen kann stark vereinfacht auf drei Schritte reduziert werden (Abbildung 6). Zu Beginn bilden Enzym und Substrat einen nicht kovalenten Komplex. Ausgehend von diesem nicht kovalenten Komplex wird das gemischte Disulfid durch Angriff eines Cysteins aus dem Substrat am katalytischen Disulfid des Enzyms gebildet. Seine Auflösung durch einen weiteren Angriff eines Substratcysteins am gemischten Disulfid führt zur Freisetzung des oxidierten Substrats. Durch die Analyse dieser drei Schritte für die Interaktion zwischen Mia40 und Cox17 konnte ein

neuer, detaillierterer Mechanismus für die Substratoxidation durch Mia40 aufgestellt werden (Abbildung 50).

In Schritt 1 bildet Mia40 mit Cox17 einen hoch dynamischen, nicht kovalenten Komplex mit sehr kurzer Lebensdauer aus. Die Affinität von Mia40 zu Cox17 wird durch hydrophobe Bereiche des Substrats, insbesondere durch die ILF- und die MISS/ITS-Sequenz, bestimmt. Ein wichtiges strukturelles Merkmal von Mia40, das den Katalysemechanismus beeinflusst, ist die direkte Nachbarschaft von Substratbindungsfurche und katalytischem Disulfid. Dies ermöglicht es Mia40 selektiv mit Substratcysteinen in einer hydrophoben Umgebung zu interagieren. Die hydrophoben Reste der ILF-Sequenz binden an die ebenfalls hydrophobe und hoch konservierte Umgebung des katalytischen Disulfids von Mia40 und richten Cys36 aus Cox17 optimal aus, damit es in Schritt 2 sehr schnell das gemischte Disulfid mit dem Enzym bilden kann. Dessen Reduktionspotential ist mit -240 mV deutlich negativer, als das des katalytischen Disulfids in Mia40 (-160 mV). Damit ist es wesentlich stabiler gegenüber Reduktion und somit auch langlebig.

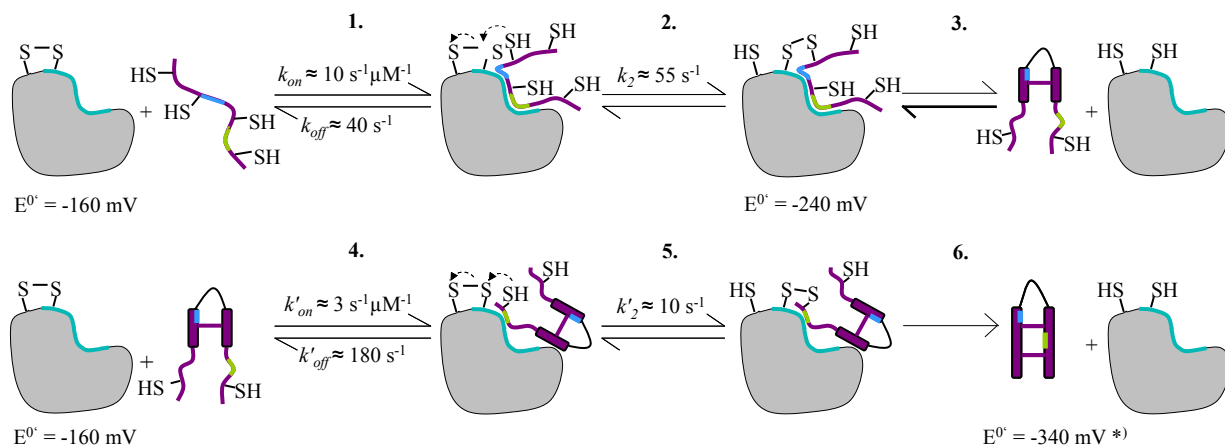


Abbildung 50: Modell der Substratoxidation durch Mia40. Gezeigt ist die Oxidation von Cox17 (magenta) durch Mia40 (grau). Wichtige Sequenzbereiche der Proteine sind farbig markiert. Die hydrophobe Bindungsfurche von Mia40 ist türkis, die ILF-Sequenz blau und die MISS/ITS-Sequenz grün dargestellt. Weiterhin sind die Standardreduktionspotentiale E^0 der gezeigten Disulfide unter den jeweiligen Spezies angegeben. *) Das Reduktionspotential für Cox17 wurde aus Voronova *et al.*, 2007 entnommen.

Die Auflösung des kovalenten Komplexes durch Cys47 in Schritt 3 führt zur Freisetzung eines teiloxidierten Intermediats, das das innere Disulfid (Cys36-Cys47) enthält. Dieses Intermediat ist nur teilweise strukturiert und in Gegenwart von Mia40 nur bedingt stabil. Die MISS/ITS-Sequenz ist wegen der fehlenden Strukturierung nach wie vor zugänglich und vermittelt die weitere Interaktion mit Mia40. Diese kann in einer produktiven und einer unproduktiven Richtung verlaufen. Ist reduziertes Mia40 vorhanden, so kann ein Cystein seines aktiven Zentrums das instabile Disulfid des Substrats angreifen, was der Rückreaktion zum initialen gemischten Disulfid entspricht. Reagiert das Intermediat jedoch mit oxidiertem Mia40, wie in Schritt 4 gezeigt, ist dies der produktive Weg hin zum voll oxidierten Substrat.

Das zweite gemischte Disulfid bildet sich zwischen Mia40 und Cys57 in Cox17 aus (Schritt 5). Auch dieses intermolekulare Disulfid wird durch die günstigen hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat stabilisiert. Daher ist die Freisetzung des voll氧idierten, nativ gefalteten Cox17 aus dem Komplex in Schritt 6 langsam. Korrekt oxidiertes Cox17 enthält zwei stabile Disulfide mit einem Reduktionspotential von -340 mV (Voronova *et al.*, 2007). Es ist nativ gefaltet und bindet daher nicht mehr an Mia40. Der Energiegewinn durch das Erreichen des nativen Faltungszustands des Substrats liefert die Triebkraft für die oxidative Faltung.

4.7 Die katalytischen Eigenschaften von Mia40 entsprechen den Anforderungen an einen Faltungshelfer im mitochondrialen Intermembranraum

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der oxidativen Faltung von Cox17 durch Mia40 untersucht. Die Ergebnisse und der Vergleich mit DsbA und PDI helfen, die biologische Funktion von Mia40 im mitochondrialen Intermembranraum besser zu verstehen.

Obwohl Mia40 zur Enzymfamilie der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen gehört, nimmt es keine Thioredoxin-ähnliche Struktur ein, wie die große Mehrheit dieser Enzyme. Dies ist besonders überraschend, da der mitochondriale Intermembranraum topologisch dem bakteriellen Periplasma entspricht. Dennoch besitzt er ein Oxidationssystem, das nicht mit dem bakteriellen Dsb-System verwandt ist. Mia40 besteht aus einer einfachen Helix-Schleife-Helix-Struktur mit zwei CX₉C-Motiven, die zwei strukturelle Disulfide ausbilden. Damit besitzt es unerwartete Ähnlichkeit zu vielen seiner Substrate. Mia40 wird, wie alle anderen IMS-Proteine, im Cytosol exprimiert und muss anschließend in die Mitochondrien transportiert werden. Für den Transport benötigt es das mitochondriale Disulfid-Staffelsystem, d.h. Mia40 ist sein eigenes Substrat (Chatzi *et al.*, 2013; Sztolsztener *et al.*, 2013). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Mia40 und vielen Substratproteinen könnte dazu beitragen, dass nicht nur die Substrate, sondern auch das Enzym selbst effizient importiert und durch Mia40 oxidiert werden können.

Mia40 teilt grundlegende mechanistische Eigenschaften mit anderen Vertretern der Oxidoreduktasen, wie DsbA oder PDI und auch anderen Enzymklassen. Durch Bindung an hydrophobe Bereiche wird die effektive Konzentration des Substrats nahe am katalytischen Zentrum erhöht und so die Katalyse erleichtert. Die Bindung ist sehr dynamisch, was auch für Prolylisomerasen beobachtet worden war, um effektiven Transfer zum aktiven Zentrum zu gewährleisten (Geitner & Schmid, 2012; Zoldak *et al.*, 2013). Durch Bildung eines kovalenten Intermediats mit dem Substrat und Angriff eines weiteren Cysteins aus dem Substrat wird ein Disulfid in das Substrat eingeführt. Die Oxidoreduktasen selbst besitzen dabei keine Information über die korrekte, native Disulfidverbrückung. Diese Information ist vielmehr in der Aminosäuresequenz des Substrats kodiert. Ist die richtige Disulfidverbrückung erreicht, faltet das Protein in den stabilen, nativen Zustand und macht so

den letzten Schritt der Katalyse irreversibel. Dies ist ein allgemeines Prinzip enzymatisch katalysierter, unidirektionaler Reaktionen und gilt auch für Mia40.

Mia40 zeigt jedoch auch Besonderheiten, durch die es sich deutlich von den entsprechenden Enzymen des bakteriellen Periplasmas oder des ER unterscheidet. Mia40 besitzt keine räumlich getrennte Chaperondomäne, sondern eine eher kleine, hydrophobe Furche in der katalytischen Domäne, über die unspezifisch entfaltete Proteine gebunden werden. Auch ist es das einzige Protein mit Thioloxygenasefunktion, das bisher in Mitochondrien identifiziert wurde, wohingegen viele Vertreter der PDI-Familie bekannt sind. Dies könnte daran liegen, dass es im IMS, der nur ca. 50-100 verschiedene Proteine enthält, eine eher geringe Anzahl von Substraten gibt, von denen viele ähnlich strukturiert und klein sind. Im Gegensatz dazu werden tausende Proteine über den Sekretionsweg in das ER transportiert. Diese Proteine sind zum Teil sehr groß und besitzen unterschiedliche Strukturen. Wegen der großen Diversität an Substraten gibt es viele PDI-Proteine, die vermutlich unterschiedliche Spezifitäten besitzen. Manche dieser Proteine enthalten spezialisierte Chaperondomänen, um effektiv unterschiedliche Substrate zu erkennen, sowie zwei aktive Zentren um eine schnelle Katalyse zu gewährleisten.

Mia40 reagiert präferenziell mit Cysteinen in einer hydrophoben Umgebung, was die frühe Bildung von Disulfiden, die im Proteininnern vergraben werden, begünstigt. Dies wird durch die Nachbarschaft von aktivem Zentrum und Substratbindungsstelle vermittelt. Für DsbA und PDI existiert diese Nähe nicht und es gibt keine Hinweise darauf, dass die Ausbildung des ersten gemischten Disulfids gerichtet abläuft. Vielmehr werden Disulfide zufällig eingeführt, wobei benachbarte Cysteine des Substrats bevorzugt verknüpft werden. Da die Disulfiddichte im Periplasma eher gering ist und viele Proteine nur je zwei Cysteine enthalten, ist DsbA in erster Linie für schnelle und nicht für korrekte Oxidation optimiert. Entstehen dennoch nicht native Disulfide, können diese Fehler durch die Disulfidisomerase DsbC korrigiert werden. PDI vereint die Oxidase- und Isomerasefunktion in einem Enzym und kann daher auch ohne die bevorzugte Bildung nativer Disulfide Substrate schnell und korrekt oxidieren. Auch Mia40 ist in der Lage nicht native Disulfide in Substraten zu isomerisieren, jedoch mit geringer Effizienz. Ob diese Funktion biologisch relevant ist, beispielsweise für die Faltung komplexer Substrate mit mehreren Disulfiden, ist noch nicht bekannt.

DsbA und PDI sind sehr effektive Enzyme, die Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen stark beschleunigen. Daher können keine kovalenten Enzym-Substrat-Intermediate isoliert werden. Mia40 dagegen bildet *in vivo* und *in vitro* langlebige gemischte Disulfide aus. Dies hängt mit der Funktion von Mia40 als Importrezeptor zusammen. Die reduzierten Substrate werden über die TOM-Pore aus dem Cytosol importiert und können im entfalteten Zustand die Membran in beide Richtungen passieren. Mia40 ist vermutlich das erste Protein, das im IMS mit den hereinkommenden Substraten interagiert. Durch diese initiale Wechselwirkung wird verhindert, dass das Substrat sofort wieder ins Cytosol zurückdiffundiert. Dementsprechend ist die Ausbildung des gemischten Disulfids mit Mia40 sehr schnell, um den Import zunächst

irreversibel zu machen. Ob Mia40 bereits mit dem Substrat interagiert, während sich Teile der Polypeptidkette noch in der TOM-Pore befinden, und den Transport so in eine Richtung dirigiert, ist dabei noch ungeklärt. Die Langlebigkeit des gemischten Disulfids könnte als eine Art Haltefunktion dienen, um die Substrate im Mitochondrium zu fixieren, bis die native Struktur erreicht ist. Die Importfunktion von Mia40 ähnelt dem Wirkprinzip von mitochondrialem Hsp70, das Substrate, die durch den TOM-Komplex transportiert werden, aktiv in die Matrix zieht (De Los Rios *et al.*, 2006). Diese Reaktion ist jedoch unabhängig von Cysteinen und benötigt ATP.

Die Substrate von PDI werden kotranslational ins ER transportiert und die Verlängerung der Peptidkette durch das Ribosom liefert die Triebkraft für die Translokation (Rapoport *et al.*, 1996; Walter & Johnson, 1994). Im bakteriellen Periplasma werden die meisten Proteine aus dem Cytosol über den Sec-Weg exportiert, was ebenfalls ein unidirektionaler, ATP- und Membranpotential-abhängiger Prozess ist (Manting & Driessen, 2000). Daher ist die schnelle Interaktion der Substrate mit DsbA oder PDI nicht notwendig für den Import.

Die biologische Funktion von Mia40 besteht darin, Proteine, die aus dem Cytosol importiert werden, oxidativ zu falten und diese durch Einführen der nativen Struktur im Mitochondrium zu halten. Hierfür muss Mia40 zum einen schnell und stabil mit den Substraten, die den TOM-Komplex passieren, interagieren, um eine Rückdiffusion zu verhindern. Zum anderen muss dennoch eine effiziente Oxidation und Freisetzung des Substrats aus dem Komplex mit Mia40 möglich sein. Die Langlebigkeit des gemischten Disulfids sorgt in erster Konsequenz für eine Anreicherung der Substrate im Intermembranraum. Zusätzlich wird dem Substrat ausreichend Zeit gegeben, durch mehrere Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen den nativen Zustand einzunehmen, der schließlich dem Katalysegleichgewicht entzogen wird. Struktur und Mechanismus des Enzyms sind also darauf ausgerichtet sowohl die Import-, als auch die Faltungshelferfunktion optimal zu erfüllen.

5 Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits publiziert bzw. in Vorbereitung zur Publikation:

1. Koch JR and Schmid FX (2014), Mia40 targets cysteines in a hydrophobic environment to direct oxidative protein folding in mitochondria. *Nature communications*, doi:10.1038/ncomms4041
2. Koch JR and Schmid FX, Mia40 is optimized for dual function in mitochondrial protein import and oxidative folding, Manuskript in Vorbereitung
3. Koch JR and Schmid FX, The mitochondrial thiol oxidase Mia40 employs kinetic control and conformational proofreading to direct disulfide formation. Manuskript in Vorbereitung

Im Rahmen dieser Arbeit entstand außerdem folgende Publikation, die nicht Teil der Dissertation ist:

Hoffmann-Thoms S, Weininger U, Eckert B, Jakob RP, Koch JR, Balbach J, Schmid FX (2013). Initiation of phage infection by partial unfolding and prolyl isomerization. *J Biol Chem*, **288**(18), 12979-91

6 Zusammenfassung

Die Thiol-Disulfid-Oxidase Mia40 bildet zusammen mit der Sulfhydryloxidase Erv1 ein Disulfidstaffelsystem zur oxidativen Faltung von Proteinen im mitochondrialen Intermembranraum. Substratproteine, die im Cytosol synthetisiert und anschließend durch die TOM-Pore der äußeren Mitochondrienmembran transportiert werden, werden durch Mia40 oxidiert und so durch Ausbildung des nativen Zustands an der Rückdiffusion gehindert.

Der Mechanismus der Substratoxidation durch Mia40 wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand der Interaktion mit dem natürlichen Substrat Cox17 untersucht. Wildtyp-Cox17 enthält vier Cysteine, die zwei Disulfidbrücken bilden. Zusätzlich wurden Cox17-Varianten verwendet, die nur jeweils ein, bzw. zwei Cysteine enthielten und die aufgrund gezielter Aminosäuresubstitutionen unterschiedliche Hydrophobizitäten aufwiesen. Die Kinetik der oxidativen Faltung dieser Varianten durch Mia40 wurde durch spektroskopische Messungen nach schneller Mischung und durch elektrophoretische Methoden analysiert. Weiterhin wurden die pK-Werte von Cysteinen aus Mia40 und Cox17 und die Reduktionspotentiale der gemischten Disulfide, sowie die konformationellen Stabilitäten der Proteine untersucht, um die molekularen Determinanten der Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen zu bestimmen.

Mia40 bildet zunächst über eine flache, hydrophobe Furche einen nicht kovalenten Komplex mit reduzierten Substratproteinen aus. Diese Bindung ist hoch dynamisch und nicht auf natürliche Substrate beschränkt. Die Affinität von Mia40 zu Proteinen steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Exposition hydrophober Bereiche und damit mit dem Faltungszustand. Aus diesem Grund interagiert Mia40 nicht mehr mit oxidiertem, nativ gefaltetem Cox17.

Die vier Cysteine von Cox17 reagieren sehr unterschiedlich mit Mia40. Das hochreaktive Cys36 wird durch die drei benachbarten hydrophoben Aminosäuren Ile, Leu und Phe optimal zum aktiven Zentrum von Mia40 hin ausgerichtet und reagiert daher 400-fach schneller als Cys26 zum gemischten Disulfid. Ausgehend von diesem initialen Intermediat mit Cys36 können durch Angriff eines der drei verbliebenen Cysteine in Cox17 ein natives, oder je eines von zwei nicht nativen Disulfiden im Substrat ausgebildet werden. Die Bildung des korrekten Disulfids ist kinetisch stark begünstigt, so dass zunächst eine teiloxidierte Cox17-Spezies mit einem nativen Disulfid freigesetzt wird. Dieses Intermediat ist nach wie vor weitgehend unstrukturiert und kann so für den nachfolgenden Katalysezyklus gut mit einem weiteren Mia40-Molekül interagieren. In dieser Reaktion wird dann das zweite native Disulfid gebildet, was der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der oxidativen Faltung von Cox17 ist. Mia40 besitzt keine Information über den korrekten Faltungsweg der Substrate. Vielmehr wird die Freisetzung des oxidierten Proteins aus dem Komplex mit Mia40 thermodynamisch durch die konformationelle Faltung des Substrats und die Einnahme des stabilen nativen Zustands angetrieben.

Die eukaryotische Oxidoreduktase PDI aus dem endoplasmatischen Retikulum und die bakterielle Thioloxygenase DsbA aus dem Periplasma führen Disulfidbrücken wesentlich schneller in Cox17 ein, als Mia40 dies vermag. Allerdings werden zunächst hauptsächlich falsche Disulfide gebildet. Dies kann durch die Disulfidisomerasefunktion von PDI korrigiert werden, bei Oxidation durch DsbA bleiben die nicht nativen Disulfidbrücken bestehen. Die Oxidation von Cox17 durch Mia40 führt hingegen zu korrekt verbrücktem, nativem Protein. Dies liegt in erster Linie an der extremen Langlebigkeit der gemischten Disulfide, bedingt durch günstige hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Mia40 und Cox17. Diese Interaktionen führen zu einer Erhöhung der Konformationsstabilität von Mia40 im Komplex und damit einhergehend zu einer starken Erniedrigung des Reduktionspotentials des gemischten Disulfids gegenüber dem katalytischen Disulfid in Mia40. Die Langlebigkeit der gemischten Disulfide zwischen Mia40 und Substratproteinen ist eine wichtige Eigenschaft um dem Substrat im gebundenen Zustand ausreichend Zeit zu geben, um über mehrere Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen ein stabiles, intramolekulares Disulfid zu bilden, das von Mia40 freigesetzt wird. Außerdem sorgt die Langlebigkeit des kovalenten Komplexes dafür, dass importierte, entfaltete Proteine zunächst im Intermembranraum gehalten werden.

Fehlverbrückte Spezies konnten während der Oxidation von reduziertem Cox17 durch Mia40 mittels Gelelektrophorese nicht nachgewiesen werden. Die einfache Struktur des Substrats und die gerichtete initiale Reaktion von Mia40 mit Cys36 in Cox17, sowie die kinetische Kontrolle der Auflösung des gemischten Disulfids zugunsten der Bildung des ersten nativen Disulfids im Substrat, könnten tatsächlich zur nahezu ausschließlichen Bildung von nativem Cox17 führen. Anhand der Isomerisierung von künstlich fehlverbrücktem Cox17 in den nativen Zustand konnte aber nachgewiesen werden, dass Mia40 neben der reinen Thioloxygenase- auch eine schwache, aber signifikante Disulfidisomerasefunktion besitzt. Sie könnte für die korrekte oxidative Faltung komplexer Substrate essentiell sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die mechanistischen Besonderheiten von Mia40 im Vergleich zu den gut untersuchten Enzymen der Thioredoxinfamilie. Die für Mia40 spezifische Nähe von hydrophober Bindungsfurche und katalytischem Disulfid stabilisiert das gemischte Disulfid mit Substratproteinen. Dies ist sowohl für den vektoriellen Transport der Proteine in den Intermembranraum, als auch für die Bildung nativer Disulfide im Substrat essentiell. Die simultane Optimierung von Mia40 für die schnelle Bildung langlebiger kovalenter Enzym-Substrat-Komplexe und die dennoch relativ effiziente Freisetzung oxidierten Substrats zeigt, dass Mia40 hervorragend an die duale Funktion als Importrezeptor und zentrale Thioloxygenase des mitochondrialen Intermembranraums angepasst ist.

7 Summary

The thiol oxidase Mia40 and the sulfhydryl oxidase Erv1 constitute a disulfide relay system in the mitochondrial intermembrane space for the oxidative folding of proteins. Substrate proteins are synthesized in the cytosol and subsequently transported into the mitochondria via the TOM-pore in the outer membrane. In the intermembrane space, they become oxidized by Mia40 and the formation of the native structure prevents diffusion back into the cytosol.

In this thesis, the mechanism of substrate oxidation by Mia40 was analyzed using the natural substrate Cox17. Wildtype Cox17 contains four cysteines that form two disulfide bonds. Additionally, Cox17 sequence variants were used that contained only one or two cysteines, respectively, and that differed in their hydrophobicity. The kinetics of oxidative folding of these variants was analyzed with spectroscopic measurements after rapid mixing and with electrophoretic methods. Moreover, the pK values of the cysteines in Mia40 and Cox17, the reduction potentials of the mixed disulfides and the conformational stabilities of the proteins were determined to identify the molecular determinants of the thiol-disulfide exchange reactions.

Mia40 initially forms a non covalent complex with reduced substrate proteins via a shallow, hydrophobic groove. This binding is highly dynamic and not restricted to natural substrates. Rather, the binding affinity of Mia40 to proteins is directly related to the exposure of hydrophobic residues and thereby to their folding state. Therefore, the interaction between Mia40 and oxidized, folded Cox17 is abolished.

The four cysteines in Cox17 differ strongly in their reactivity towards Mia40. The highly reactive Cys36 is oriented ideally towards the active site in Mia40 by the steering function of the three neighboring, hydrophobic amino acids Ile, Leu and Phe and therefore reacts 400-fold more rapidly than Cys26 to form the mixed disulfide. The mixed disulfide between Mia40 and Cys36 from Cox17 can be resolved by an attack from any of the three remaining substrate cysteines to form either a native, or one of two non native disulfides. Formation of the native disulfide is kinetically strongly favored and therefore a partially oxidized Cox17 species with one native disulfide is released. This folding intermediate is still largely unstructured and thus able to efficiently interact with another Mia40 molecule for a second cycle of catalysis. In this reaction, the second native disulfide is formed, which is the rate limiting step of catalysis. Mia40 itself does not contain information about the correct folding state of the substrate. Rather, the release of oxidized Cox17 from the complex with Mia40 is thermodynamically driven by the conformational folding of the substrate that energetically favors the oxidized structure.

The eukaryotic oxidoreductase PDI from the endoplasmic reticulum and the prokaryotic thiol oxidase DsbA from the periplasm oxidize Cox17 much faster than Mia40. However, initially mainly non native disulfides are formed. They can be corrected by the disulfide isomerase

activity of PDI, but not by DsbA. Oxidation of Cox17 by Mia40 leads to the correctly folded, native substrate. This is mainly due to the persistence of the mixed disulfides, mediated by hydrophobic interactions between Mia40 and Cox17. The structure of Mia40 within the mixed disulfide is stabilized compared to the isolated oxidized and reduced forms, which concomitantly leads to a strong decrease of the reduction potential of the mixed disulfide compared to the catalytic disulfide in Mia40. The formation of long-lived mixed disulfides between Mia40 and substrates is an important feature to provide the bound substrate with enough time to explore multiple ways of thiol disulfide exchange reactions to select the most stable conformation that is finally released from Mia40. Furthermore, the persistence of the covalent complex helps to transiently retain imported, unfolded proteins in the intermembrane space.

With electrophoretic methods, scrambled intermediates could not be detected during oxidative folding of Cox17 by Mia40. This could be due to the very simple structure of Cox17, the preferred initial reaction of Mia40 with Cys36 in Cox17 and the kinetic control of the dissolution of the mixed disulfide that favors formation of the native disulfide. By analyzing the isomerisation of artificially scrambled Cox17 with reduced Mia40, it could be shown that Mia40 also exhibits disulfide isomerase activity. Acting as an isomerase could be an essential prerequisite to correctly oxidize and fold more complex substrates.

The results of this work underline the distinctive features of the mechanism of action of Mia40 compared to the well established folding helper enzymes of the thioredoxin family. The proximity of the hydrophobic substrate binding groove and the catalytic disulfide, that is characteristic for Mia40, stabilizes the mixed disulfides with substrate proteins. This is important for the unidirectional transport of the proteins into the intermembrane space, as well as for the formation of native disulfides in the substrate. The simultaneous optimization of Mia40 for the rapid formation of long-lived mixed disulfides and the still effective release of oxidized substrates points to an excellent adaption of Mia40 to the dual function as initial import receptor and central oxidase of the mitochondrial intermembrane space.

8 Abkürzungsverzeichnis

AEDANS	5-(((Acetylamino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
CD	Circulardichroismus
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cCMP	Cytidin 2'3'-cyclisches Monophosphat
ΔC_p	Wärmekapazitätsänderung während der Entfaltung eines Proteins bei konstantem Druck
COX	Cytochrom c Oxidase
Cox17*	Cox17 aus <i>S. cerevisiae</i> mit den Substitutionen C16S, C23S, C24S
Cox17* _{1Cys}	Cox17* das nur je eines der vier Cysteine (Cys26, Cys36, Cys47, Cys57) enthält
Cox17* _{0Cys}	Cox17* mit den Substitutionen C26A, C36I, C47A, C57S
Cox17* _{SSaußen}	Cox17* mit den Substitutionen C36I, C47A
Cox17* _{SSinnen}	Cox17* mit den Substitutionen C26A, C57S
Cox17* _{26C36C}	Cox17* mit den Substitutionen C47A, C57S
Cox17* _{36C57C}	Cox17* mit den Substitutionen C26A, C47A
scCox17*	Mischung aus nativem und fehlverbrücktem Cox17*
CPC-Motiv	katalytisches Disulfid in Mia40 (C296, P297, C298)
CXXC-Motiv	allgemeiner Aufbau des katalytischen Disulfids Thioredoxin-ähnlicher Oxidoreduktasen in dem die beiden Cysteine durch zwei weitere Aminosäuren (X) getrennt sind
Cyt c	Cytochrom c
d	Schichtdicke
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>DpnI</i>	Restriktionsendonuklease I aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>
DsbA	Thioloxidase (<u>disulfide bond</u>) aus <i>E. coli</i>
DsbC	Disulfidisomerase (<u>disulfide bond</u>) aus <i>E. coli</i>
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), Ellmans Reagenz
DTT	Dithiothreitol
dYT	double yeast-tryptone-Medium
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
$E^{0'}$	Biochemisches Standardreduktionspotential
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erv1	<i>essential for respiration and vegetative growth</i> , Sulfhydryloxidase aus <i>S. cerevisiae</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
F	Faraday-Konstante
ΔG_{Stab}	freie Enthalpie der Stabilisierung durch Disulfidbildung
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GC	Gelfiltrationschromatographie
GSH	reduziertes Glutathion

GSSG	oxidiertes Glutathion
Ia	Iodacetat
Iam	Iodacetamid
IAEDANS	5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
ILF-Sequenz	Aminosäuren Ile37, Leu38, Phe39 in Cox17 aus <i>S. cerevisiae</i>
IMS	<i>intermembrane space</i> , mitochondrialer Intermembranraum
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
k_{on}	mikroskopische Rate der Assoziation
k_{off}	mikroskopische Rate der Dissoziation
K_D	Dissoziationskonstante
Km	Kanamycin
MBP	Maltose-Bindeprotein
Mia40	<i>mitochondrial import and assembly</i> aus <i>S. cerevisiae</i> , verkürztes Protein (AS 284-403)
Mia40 _{C296SC298S}	Mia40 mit den Substitutionen C296S und C298S
Mia40 _{W294FC298S}	Mia40 mit den Substitutionen W294F und C298S
Mia40 _{CAC}	Mia40 mit der Substitution P297A
Mia40 _{CGHC}	Mia40-Variante in der die katalytischen Cysteine durch die Aminosäuren Gly und His getrennt sind
Mia40 _{CPHC}	Mia40-Variante in der die katalytischen Cysteine durch die Aminosäuren Gly und Pro getrennt sind
MISS/ITS	<i>mitochondria IMS sorting signal/IMS targeting signal</i> ; hydrophobe Aminosäuresequenz (Phe50, Ile51, Tyr54) in Cox17 aus <i>S. cerevisiae</i>
n	Anzahl der in einer Redoxreaktion übertragenen Elektronen
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDI	Protein Disulfid Isomerase aus <i>S. cerevisiae</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pK	negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante einer Säure
<i>pNa</i>	<i>para</i> -Nitroanilin
PNK	Polynukleotidkinase
R	Allgemeine Gaskonstante
RNase A	Ribonuklease A
RNase T1	Ribonuklease T1
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>revolution per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Senp2	<i>Sentrin-specific protease 2</i>
S _N 2	bimolekulare nukleophile Substitutionsreaktion
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
SS	Disulfidbrücke
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin

TOM	<i>translocase of the outer membrane</i> ; Transportprotein in der äußeren Mitochondrienmembran
Tricin	N-(Tris(hydroxymethyl)-methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T4-PNK	Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4
T_M	Mittelpunkt des thermischen Entfaltungsübergangs
$[\theta]_{MRW}$	molare Elliptizität pro Aminosäure ($\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)
U	Unit (Enzymmenge, die unter Standardbedingungen einen Umsatz von 1 μmol Substrat pro min erzeugt)
ÜNK	Übernachtskultur
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp (Protein mit unveränderter Aminosäuresequenz)

Aminosäuren wurden mit dem üblichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

9 Literaturverzeichnis

- Abajian, C., *et al.* (2004). Yeast cox17 solution structure and Copper(I) binding. *J Biol Chem* **279**, 53584-92.
- Abramoff M.D., M. P. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Allen, S., *et al.* (2005). Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol* **353**, 937-44.
- Allen, S., *et al.* (2003). Juxtaposition of the two distal CX3C motifs via intrachain disulfide bonding is essential for the folding of Tim10. *J Biol Chem* **278**, 38505-13.
- Anfinsen, C. B., *et al.* (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **47**, 1309-14.
- Arnesano, F., *et al.* (2005). Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure* **13**, 713-22.
- Aroun, A., *et al.* (2011). Iron, oxidative stress and the example of solar ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol Sci* **11**, 118-34.
- Aslund, F., *et al.* (1997). Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J Biol Chem* **272**, 30780-6.
- Bader, M., *et al.* (1998). Reconstitution of a protein disulfide catalytic system. *J Biol Chem* **273**, 10302-7.
- Banci, L., *et al.* (2010). Molecular chaperone function of Mia40 triggers consecutive induced folding steps of the substrate in mitochondrial protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20190-5.
- Banci, L., *et al.* (2009). MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 198-206.
- Banci, L., *et al.* (2008a). Mitochondrial copper(I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6803-8.
- Banci, L., *et al.* (2008b). A structural-dynamical characterization of human Cox17. *J Biol Chem* **283**, 7912-20.
- Bardwell, J. C., *et al.* (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**, 581-9.
- Bien, M., *et al.* (2010). Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione. *Mol Cell* **37**, 516-28.
- Bihlmaier, K., *et al.* (2007). The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol* **179**, 389-95.
- Bourens, M., *et al.* (2012). Role of twin Cys-Xaa9-Cys motif cysteines in mitochondrial import of the cytochrome C oxidase biogenesis factor Cmc1. *J Biol Chem* **287**, 31258-69.
- Brandes, N., *et al.* (2009). Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxid Redox Signal* **11**, 997-1014.
- Burns, J. A. & Whitesides, G. M. (1990). Predicting the stability of cyclic disulfides by molecular modeling: effective concentrations in thiol-disulfide interchange and the design of strongly reducing dithiols. *Journal of the American Chemical Society* **112**, 6296.
- Cater, M. A., *et al.* (2007). Copper binding to the N-terminal metal-binding sites or the CPC motif is not essential for copper-induced trafficking of the human Wilson protein (ATP7B). *Biochem J* **401**, 143-53.
- Chacinska, A., *et al.* (2008). Mitochondrial biogenesis, switching the sorting pathway of the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem* **283**, 29723-9.
- Chacinska, A., *et al.* (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628-44.
- Chacinska, A., *et al.* (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *Embo J* **23**, 3735-46.
- Chakravarthi, S., *et al.* (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep* **7**, 271-5.

- Chatzi, A., *et al.* (2013). Biogenesis of yeast Mia40 - uncoupling folding from import and atypical recognition features. *Febs J* **280**, 4960-9.
- Creighton, T. (1995). Disulphide-coupled protein folding pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **348**, 5-10.
- Creighton, T. E. (1978). Experimental studies of protein folding and unfolding. *Prog Biophys Mol Biol* **33**, 231-97.
- Creighton, T. E. (1979). Intermediates in the refolding of reduced ribonuclease A. *J Mol Biol* **129**, 411-31.
- Creighton, T. E., *et al.* (1980). Catalysis by protein-disulphide isomerase of the unfolding and refolding of proteins with disulphide bonds. *J Mol Biol* **142**, 43-62.
- Crook, E. M., *et al.* (1960). Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2':3'-phosphate. *Biochem J* **74**, 234-8.
- Dabir, D. V., *et al.* (2007). A role for cytochrome c and cytochrome c peroxidase in electron shuttling from Erv1. *Embo J* **26**, 4801-11.
- De Los Rios, P., *et al.* (2006). Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6166-71.
- Deponte, M. & Hell, K. (2009). Disulphide bond formation in the intermembrane space of mitochondria. *J Biochem* **146**, 599-608.
- Drose, S. & Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol* **748**, 145-69.
- Dryhurst, G. (1977). *Electrochemistry of Biological Molecules*, Academic Press.
- Eisenberg, D., *et al.* (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol* **179**, 125-42.
- Farrell, S. R. & Thorpe, C. (2005). Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome c reductase activity. *Biochemistry* **44**, 1532-41.
- Frand, A. R. & Kaiser, C. A. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **4**, 469-77.
- Frech, C., *et al.* (1996). Preferential binding of an unfolded protein to DsbA. *Embo J* **15**, 392-98.
- Freedman, R. B., *et al.* (1998). Experimental and theoretical analyses of the domain architecture of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biol Chem* **379**, 321-8.
- Geitner, A. J. & Schmid, F. X. (2012). Combination of the human prolyl isomerase FKBP12 with unrelated chaperone domains leads to chimeric folding enzymes with high activity. *J Mol Biol* **420**, 335-49.
- Ghaemmighami, S., *et al.* (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737-41.
- Gleiter, S. & Bardwell, J. C. (2008). Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 530-4.
- Glerum, D. M., *et al.* (1996). Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **271**, 14504-9.
- Goldberger, R. F., *et al.* (1963). Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem* **238**, 628-35.
- Goldenberg, D. P., *et al.* (1993). Probing the determinants of disulfide stability in native pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* **32**, 2835-44.
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982). Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J Mol Biol* **156**, 911-26.
- Grauschopf, U., *et al.* (1995). Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell* **83**, 947-55.
- Gross, D. P., *et al.* (2011). Mitochondrial Ccs1 contains a structural disulfide bond crucial for the import of this unconventional substrate by the disulfide relay system. *Mol Biol Cell* **22**, 3758-67.
- Gross, E., *et al.* (2004). Structure of Ero1p, source of disulfide bonds for oxidative protein folding in the cell. *Cell* **117**, 601-10.
- Gross, E., *et al.* (2002). A new FAD-binding fold and intersubunit disulfide shuttle in the thiol oxidase Erv2p. *Nat Struct Biol* **9**, 61-7.
- Hawkins, H. C. & Freedman, R. B. (1991). The reactivities and ionization properties of the active-site dithiol groups of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biochem J* **275 (Pt 2)**, 335-9.

- Heaton, D., *et al.* (2000). Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *J Biol Chem* **275**, 37582-7.
- Herrmann, J. M., *et al.* (2012). Biogenesis of mitochondrial proteins. *Adv Exp Med Biol* **748**, 41-64.
- Herrmann, J. M. & Riemer, J. (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid Redox Signal* **13**, 1341-58.
- Holmgren, A. & Aslund, F. (1995). Glutaredoxin. *Methods Enzymol* **252**, 283-92.
- Holst, B., *et al.* (1997). Active site mutations in yeast protein disulfide isomerase cause dithiothreitol sensitivity and a reduced rate of protein folding in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **138**, 1229-38.
- Hu, J., *et al.* (2008). The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* **283**, 29126-34.
- Inaba, K. & Ito, K. (2002). Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. *Embo J* **21**, 2646-54.
- Iwata, S., *et al.* (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* **281**, 64-71.
- Jensen, K. S., *et al.* (2009). Kinetic and thermodynamic aspects of cellular thiol-disulfide redox regulation. *Antioxid Redox Signal* **11**, 1047-58.
- Kamitani, S., *et al.* (1992). Identification and characterization of an Escherichia coli gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *Embo J* **11**, 57-62.
- Kawano, S., *et al.* (2009). Structural basis of yeast Tim40/Mia40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14403-7.
- Keire, D. A., *et al.* (1992). Kinetics and equilibria of thiol/disulfide interchange reactions of selected biological thiols and related molecules with oxidized glutathione. *J. Org. Chem.* **57**, 123-127.
- Klomsiri, C., *et al.* Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1065-77.
- Klomsiri, C., *et al.* (2011). Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1065-77.
- Kloppel, C., *et al.* (2011). Mia40-dependent oxidation of cysteines in domain I of Ccs1 controls its distribution between mitochondria and the cytosol. *Mol Biol Cell* **22**, 3749-57.
- Kortemme, T., *et al.* (1996). Electrostatic interactions in the active site of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* **35**, 14503-11.
- Kuzmic, P. (2009). DynaFit--a software package for enzymology. *Methods Enzymol* **467**, 247-80.
- Lambert, N. & Freedman, R. B. (1985). The latency of rat liver microsomal protein disulphide-isomerase. *Biochem J* **228**, 635-45.
- Lappi, A. K., *et al.* (2004). A conserved arginine plays a role in the catalytic cycle of the protein disulphide isomerases. *J Mol Biol* **335**, 283-95.
- Lisowsky, T. (1992). Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* **232**, 58-64.
- Longen, S., *et al.* (2009). Systematic analysis of the twin cx(9)c protein family. *J Mol Biol* **393**, 356-68.
- Lu, H. & Woodburn, J. (2005). Zinc binding stabilizes mitochondrial Tim10 in a reduced and import-competent state kinetically. *J Mol Biol* **353**, 897-910.
- Lundstrom, J. & Holmgren, A. (1993). Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfide-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochemistry* **32**, 6649-55.
- Lutz, T., *et al.* (2003). Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Embo J* **22**, 4400-8.
- Mallick, P., *et al.* (2002). Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9679-84.
- Manting, E. H. & Driessen, A. J. (2000). Escherichia coli translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**, 226-38.
- Martin, J. L., *et al.* (1993). Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature* **365**, 464-8.
- Mesecke, N., *et al.* (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* **121**, 1059-69.

- Milenkovic, D., *et al.* (2007). Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem* **282**, 22472-80.
- Milenkovic, D., *et al.* (2009). Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol Biol Cell* **20**, 2530-9.
- Missiakas, D., *et al.* (1993). Identification and characterization of the Escherichia coli gene dsbB, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7084-8.
- Molinari, M. & Helenius, A. (1999). Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**, 90-3.
- Moore, E. C., *et al.* (1964). Enzymatic Synthesis Of Deoxyribonucleotides.V. Purification And Properties Of Thioredoxin Reductase From Escherichia Coli B. *J Biol Chem* **239**, 3445-52.
- Mukai, K., *et al.* (1985). Dissociation of bovine cytochrome c1 subcomplex and the status of cysteine residues in the subunits. *J Biochem* **98**, 1417-25.
- Muller, J. M., *et al.* (2008). Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Cell* **19**, 226-36.
- Munoz, V. & Serrano, L. (1994). Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat Struct Biol* **1**, 399-409.
- Nakamura, H., *et al.* (1997). Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* **15**, 351-69.
- Naoe, M., *et al.* (2004). Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* **279**, 47815-21.
- Nelson, J. W. & Creighton, T. E. (1994). Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry* **33**, 5974-83.
- Neupert, W. & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 723-49.
- Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background And Theory. *Ann N Y Acad Sci* **121**, 321-49.
- Pace, C. N. & Creighton, T. E. (1986). The disulphide folding pathway of ribonuclease T1. *J Mol Biol* **188**, 477-86.
- Paravicini, T. M. & Touyz, R. M. (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* **71**, 247-58.
- Pollard, M. G., *et al.* (1998). Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **1**, 171-82.
- Porat, A., *et al.* (2004). The unusual transmembrane electron transporter DsbD and its homologues: a bacterial family of disulfide reductases. *Res Microbiol* **155**, 617-22.
- Rabenstein, D. L. & Weaver, K. H. (1996). Kinetics and Equilibria of the Thiol/Disulfide Exchange Reactions of Somatostatin with Glutathione. **61**, 7391-7397.
- Rabenstein, D. L. & Yeo, P. L. (1994). Kinetics and Equilibria of the Formation and Reduction of the Disulfide Bonds in Arginine-Vasopressin and Oxytocin by Thiol/Disulfide Interchange with Glutathione and Cysteine. *J. Org. Chem.* **59**, 4223-4229.
- Rapoport, T. A., *et al.* (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* **65**, 271-303.
- Rehder, D. S. & Borges, C. R. (2010). Cysteine sulfenic acid as an intermediate in disulfide bond formation and nonenzymatic protein folding. *Biochemistry* **49**, 7748-55.
- Riddles, P. W., *et al.* (1979). Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination. *Anal Biochem* **94**, 75-81.
- Rissler, M., *et al.* (2005). The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins. *J Mol Biol* **353**, 485-92.
- Rothwarf, D. M., *et al.* (1998). Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A: detailed kinetic analysis of two independent folding pathways. *Biochemistry* **37**, 3767-76.
- Rothwarf, D. M. & Scheraga, H. A. (1993). Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A. 1. Steady-state distribution. *Biochemistry* **32**, 2671-9.
- Ruddock, L. W., *et al.* (1996). pH-dependence of the dithiol-oxidizing activity of DsbA (a periplasmic protein thiol:disulphide oxidoreductase) and protein disulphide-isomerase: studies with a novel simple peptide substrate. *Biochem J* **315 (Pt 3)**, 1001-5.
- Ruoppolo, M., *et al.* (2000). Contribution of individual disulfide bonds to the oxidative folding of ribonuclease A. *Biochemistry* **39**, 12033-42.

- Schafer, F. Q. & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**, 1191-212.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
- Scheraga, H. A., *et al.* (1984). Multiple pathways for regenerating ribonuclease A. *Adv Biophys* **18**, 21-41.
- Schwartz, M. P. & Matouschek, A. (1999). The dimensions of the protein import channels in the outer and inner mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13086-90.
- Shi, Y., *et al.* (2008). Zinc binding site in PICK1 is dominantly located at the CPC motif of its PDZ domain. *Journal of Neurochemistry* **106**, 1027.
- Shukla, V., *et al.* (2011). Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci* **2011**, 572634.
- Sideris, D. P., *et al.* (2009). A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J Cell Biol* **187**, 1007-22.
- Siedler, F., *et al.* (1993). Redox potentials of active-site bis(cysteiny) fragments of thiol-protein oxidoreductases. *Biochemistry* **32**, 7488-95.
- Sone, M., *et al.* (1997). Differential in vivo roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* **272**, 10349-52.
- Studier, F. W., *et al.* (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Sztolsztener, M. E., *et al.* (2013). Disulfide bond formation: sulfhydryl oxidase ALR controls mitochondrial biogenesis of human MIA40. *Traffic* **14**, 309-20.
- Tellinghuisen, T. L., *et al.* (2006). The NS5A protein of bovine viral diarrhea virus contains an essential zinc-binding site similar to that of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol* **80**, 7450-8.
- Terziyska, N., *et al.* (2009). Structural and functional roles of the conserved cysteine residues of the redox-regulated import receptor Mia40 in the intermembrane space of mitochondria. *J Biol Chem* **284**, 1353-63.
- Terziyska, N., *et al.* (2005). Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett* **579**, 179-84.
- Thannhauser, T. W., *et al.* (1997). Kinetic studies of the regeneration of recombinant hirudin variant 1 with oxidized and reduced dithiothreitol. *Biochemistry* **36**, 2154-65.
- Tian, G., *et al.* (2006). The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell* **124**, 61-73.
- Tienison, H. L., *et al.* (2009). Reconstitution of the mia40-erv1 oxidative folding pathway for the small tim proteins. *Mol Biol Cell* **20**, 3481-90.
- Trachootham, D., *et al.* (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* **8**, 579-91.
- Tsukihara, T., *et al.* (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**, 1069-74.
- Varabyova, A., *et al.* (2013). Mia40 and MINOS act in parallel with Ccs1 in the biogenesis of mitochondrial Sod1. *Febs J* **280**, 4943-59.
- Venetianer, P. & Straub, F. B. (1963). The enzymic reactivation of reduced ribonuclease. *Biochim Biophys Acta* **67**, 166-8.
- Vitu, E., *et al.* (2006). Gain of function in an ERV/ALR sulfhydryl oxidase by molecular engineering of the shuttle disulfide. *J Mol Biol* **362**, 89-101.
- Volles, M. J., *et al.* (1999). Distribution of disulfide bonds in the two-disulfide intermediates in the regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A: further insights into the folding process. *Biochemistry* **38**, 7284-93.
- Voronova, A., *et al.* (2007). Oxidative switches in functioning of mammalian copper chaperone Cox17. *Biochem J* **408**, 139-48.
- Walter, P. & Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 87-119.
- Webb, C. T., *et al.* (2006). Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller. *Mol Cell* **21**, 123-33.

- Weckbecker, D., *et al.* (2012). Atp23 biogenesis reveals a chaperone-like folding activity of Mia40 in the IMS of mitochondria. *Embo J* **31**, 4348-58.
- Wedemeyer, W. J., *et al.* (2000). Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry* **39**, 7032.
- Wilson, J. M., *et al.* (1977). Structure-reactivity correlations for the thiol-disulfide interchange reaction. *Journal of the American Chemical Society* **99**, 7922.
- Winzeler, E. A., *et al.* (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-6.
- Wunderlich, M., *et al.* (1993). Bacterial protein disulfide isomerase: efficient catalysis of oxidative protein folding at acidic pH. *Biochemistry* **32**, 12251-6.
- Xu, X., *et al.* (1996). Nonrandom distribution of the one-disulfide intermediates in the regeneration of ribonuclease A. *Biochemistry* **35**, 6406-17.
- Zangar, R. C., *et al.* (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**, 316-31.
- Zapun, A., *et al.* (1993). The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry* **32**, 5083-92.
- Zapun, A., *et al.* (1995). Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 5075-89.
- Zavodszky, M., *et al.* (2001). Disulfide bond effects on protein stability: designed variants of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V. *Protein Sci* **10**, 149-60.
- Zhang, R. M. & Snyder, G. H. (1989). Dependence of formation of small disulfide loops in two-cysteine peptides on the number and types of intervening amino acids. *J Biol Chem* **264**, 18472-9.
- Zoldak, G., *et al.* (2013). The prolyl isomerase SlyD is a highly efficient enzyme but decelerates the conformational folding of a client protein. *J Am Chem Soc* **135**, 4372-9.

10 Anhang

10.1 Anhang – Tabellen

Die in dieser Arbeit zur Klonierung und Mutagenese von verschiedenen Protein-Varianten verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sind in Tabelle S 1 aufgeführt.

Tabelle S 1: Auflistung aller verwendeter Oligonukleotide.

Name	Basensequenz in 5'→3'Richtung	Verwendung
Oligodesoxyribonukleotide zur Mutagenese von Mia40-Varianten		
T7-Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Kolonie-PCR, Sequenzierung
T7-Terminator	GTT ATG CTA GTT ATT GCT CA	Kolonie-PCR, Sequenzierung
Mia40_W294F/C296S (-)	CAA GCA AGG ACT GTC GAA ATT TAT CTC ACC	Mutation W294F/C296S
Mia40_W294F/C296S (+)	GGA GGT ATG GCC CAT GGA CCC TGT GGT	Mutation W294F/C296S
Mia40_CXXC (-)	ACA GTC CCA ATT TAT CTC ACC AGT	Mutation des katalytischen Disulfids
Mia40_CPHC (+)	CCG CAC TGC TTG GGA GGT ATG GCC CAT GGA	Einführen der Reste Pro und His zwischen den katalytischen Cysteinen
Mia40_CGHC (+)	GGC TAC TGC TTG GGA GGT ATG GCC CAT GGA	Einführen der Reste Gly und His zwischen den katalytischen Cysteinen
BE_Mia40_P297X (+)	GGA GGT ATG GCC CAT GGA CCC TGT GGT	Mutation P297X
BE_Mia40_P297A (-)	CAA GCA CGC ACA GTC CCA ATT TAT CTC	Mutation P297A
Mia40_C296S/C298S (-)	GTC CCA ATT TAT CTC ACC AGT	Mutation des katalytischen Disulfids
Mia40_C296S (+)	TCT CCT TGC TTG GGA GGT ATG GCC CAT	Mutation C296S
Mia40_C296S (+)	TGT CCT TCC TTG GGA GGT ATG GCC CAT	Mutation C298S
Mia40_C296S/C298S (+)	TCT CCT TCC ACA GTC CCA ATT TAT CTC	Mutationen C296S und C298S
Oligodesoxyribonukleotide zur zur Mutagenese von Cox17-Varianten		
Cox17/C16S/C23S (-)	GCT TGG CTT AGG TTT GTC CTC GCT CTC CGC	Mutation C16S/C23S/C24S
Cox17/C24S (+)	AGC GTT TGT AAG CCA GAA AAG GAG	Mutation C16S/C23S/C24S
Cox17/C36I (-)	GAA TAA GAT GAT TGT ATC CCG CTC	Mutation des inneren Disulfids C36I/C47A
Cox17/C47A (+)	AAT GGA CAA GAC TCT GAA AAA GCC	Mutation des inneren Disulfids C36I/C47A
SOE_Cox17/C26A (+)	GTT GCT AAG CCA GAA AAG GAG GAG	Mutation des äußeren Disulfids über SOE; C26A/C57S

SOE_Cox17/C26A (-)	CTC CTC CTT TTC TGG CTT AGC AAC	Mutation des äußeren Disulfids über SOE; C26A/C57S
SOE_Cox17/C59S (+)	TAC AAA GAG AGC ATG AAG GGT TAT	Mutation des äußeren Disulfids über SOE; C26A/C57S
SOE_Cox17/C59S (-)	ATA ACC CTT CAT GCT CTC TTT GTA	Mutation des äußeren Disulfids über SOE; C26A/C57S
Cox17/F50W (-)	CTC TTT GTA CTT TTC AAT CCA TTC	Mutation F50W
Cox17/F50W/59C (+)	TGCATGAAGGGTTATGGCTTCGAA	Mutation F50W
Cox17/F50W/59S (+)	TCCATGAAGGGTTATGGCTTCGAA	Mutation F50W
C47:F50A(-)	GGC TTC CTT GCA TTT TTC AGA GTC TTG	Mutation F50A/I51A in Cox17* _{47C}
C47:I51A(+)	GCT GAA AAG TAC AAA GAG AGC ATG AAG	Mutation F50A/I51A in Cox17* _{47C}
C57:F50A(-)	GGC TTC CTT GGC TTT TTC AGA GTC TTG	Mutation F50A/I51A in Cox17* _{57C}
C57:I51A(+)	GCT GAA AAG TAC AAA GAG TGC ATG AAG	Mutation F50A/I51A in Cox17* _{57C}
C26:E29F(-)	AAA TGG CTT ACA AAC GCT GCT TGG CTT	Mutation E29F/K30I/R33Y in Cox17* _{26C}
C26:K30I/R33Y(+)	ATC GAG GAG TAC GAT ACA ATC ATC TTA TTC	Mutation E29F/K30I/R33Y in Cox17* _{26C}
36C/37A/38A(-)	TGC GGC GCA TGT ATC CCG CTC CTC CTT	Mutation I37A/L38A/F39A Cox17* _{36C}
36C/39A (+)	GCC AAT GGA CAA GAC TCT GAA AAA	Mutation I37A/L38A/F39A Cox17* _{36C}
36C -ITS (+)	GCT GAA AAG TAC AAA GAG AGC ATG AAG	Mutation F50A/I51A in Cox17* _{36C}
36C -ITS (-)	GGC TTC CTT GGC TTT TTC AGA GTC TTG	Mutation F50A/I51A in Cox17* _{36C}
26S Swap (-)	CTT CTC GAT AAA TTC CTT ACT AAC GCT GCT TGG CTT	MISS-swap Mutationen in Cox17* _{57C}
26Swap (+)	TAC AAG GAA ATC ATC TTA TTC AAT GGA CAA	MISS-swap Mutationen in Cox17* _{57C/26C}
26Cswap (-)	CTT CTC GAT AAA TTC CTT ACA AAC GCT GCT TGG CTT	MISS-swap Mutationen in Cox17* _{26C}
57Cswap (-)	TTC CTT TTC TGG CTT GGC TTT TTC GGA GTC TTG TCC ATT GAA TAA TAT	MISS-swap Mutationen in Cox17* _{57C/26C}
57Cswap (+)	GAG CGC GAC ACG TGC ATG AAG GGT TAT GGC TTT GAA GTT CCA AGT GCG AAT	MISS-swap Mutationen in Cox17* _{57C}
57Sswap (+)	AAG GAA GAG CGC GAC ACG TCC ATG AAG GGT TAT	MISS-swap Mutationen in Cox17* _{26C}

Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung von Erv1

Erv1_BsaI(+)	AT GGT CTCT TGGT ATG AAA GCA ATA GAT AAA ATG ACG	Klonierung von Erv1
Erv1_BamHI(-)	CG GGA TCC TTA TTC GTC CCA GCC GTC CTT CCA TCT	Klonierung von Erv1

Tabelle S 2: Nummerierte Liste aller Varianten von Cox17*, die verwendet wurden um die Reaktivität der Cysteine von Cox17 zu untersuchen.

#	Variante	Sequenz
	Cox17*	26 36 47 57 CKPEKEERDT C I L F N G Q D S E K C K E F I E K Y K E C
1	Cox17* F50W	CKPEKEERDT C I L F N G Q D S E K C K E W I E K Y K E C
2	Cox17* ^{SSinnen}	AKPEKEERDT C I L F N G Q D S E K C K E F I E K Y K E S
3	Cox17* ^{SSaußen}	CKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E C
4	Cox17* ^{SSaußen} F50W	CKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E W I E K Y K E C
5	Cox17* ^{SSinnen} F50W	AKPEKEERDT C I L F N G Q D S E K C K E W I E K Y K E S
6	Cox17* ^{0Cys}	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
7	Cox17* ^{0Cys} F50W	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E W I E K Y K E S
8	Cox17* ^{26C} -AEDANS	CKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
9	Cox17* ^{36C} -AEDANS	AKPEKEERDT C I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
10	Cox17* ^{47C} -AEDANS	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K C K E F I E K Y K E S
11	Cox17* ^{57C} -AEDANS	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E C
12	Cox17* ^{26C}	CKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
13	Cox17* ^{36C}	AKPEKEERDT C I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
14	Cox17* ^{47C}	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K C K E F I E K Y K E S
15	Cox17* ^{57C}	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E C
16	Cox17* ^{36C} 50A51A-AEDANS	AKPEKEERDT C I L F N G Q D S E K A K E A A E K Y K E S
17	Cox17* ^{47C} 50A51A-AEDANS	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K C K E A A E K Y K E S
18	Cox17* ^{57C} 50A51A-AEDANS	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E A A E K Y K E C
19	Cox17* ^{36C} 50A51A	AKPEKEERDT C I L F N G Q D S E K A K E A A E K Y K E S
20	Cox17* ^{47C} 50A51A	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K C K E A A E K Y K E S
21	Cox17* ^{57C} 50A51A	AKPEKEERDT I I L F N G Q D S E K A K E A A E K Y K E C
22	Cox17* ^{36C} 37A38A39A-AEDANS	AKPEKEERDT C A A A N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
23	Cox17* ^{36C} 37A38A39A	AKPEKEERDT C A A A N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
24	Cox17* ^{57C} 37A38A39A-AEDANS	AKPEKEERDT I A A A N G Q D S E K A K E F I E K Y K E C
25	Cox17* ^{57C} 37A38A39A	AKPEKEERDT I A A A N G Q D S E K A K E F I E K Y K E C
26	Cox17* ^{26C} 29F30I33Y-AEDANS	CKPFIIEYDT I I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
27	Cox17* ^{26C} 29F30I33Y	CKPFIIEYDT I I L F N G Q D S E K A K E F I E K Y K E S
28	Cox17* ^{26C} MISS swap-AEDANS	CKEFIEKYKE I I L F N G Q D S E K A K P E K E E R D T S
29	Cox17* ^{57C} MISS swap-AEDANS	AKEFIEKYKE I I L F N G Q D S E K A K P E K E E R D T C
30	Cox17* ^{26C} MISS swap	CKEFIEKYKE I I L F N G Q D S E K A K P E K E E R D T S

31	Cox17* _{57C} MISS swap	AKEFIEKYKEIILFNGQDSEKAKPEKEERDTC
32	Cox17* _{26C} 27I28L29F	CILFKEERDTIKPENGQDSEKAKEFIEKYKES
33	Cox17* _{26C} 27I28L29F-AEDANS	CILFKEERDTIKPENGQDSEKAKEFIEKYKES

Es ist jeweils die Aminosäuresequenz zwischen dem ersten und dem vierten Cystein von Cox17 aus *S. cerevisiae* gezeigt (Aminosäuren 26-57). Das erste CX₉C-Motiv (Reste 26-33) ist violett, das zweite CX₉C-Motiv (Reste 47-57) magenta und die hydrophoben Reste 37-39 blau gefärbt. Cysteine sind gelb, AEDANS-markierte Cysteine grün hervorgehoben.

10.2 Anhang – Abbildungen

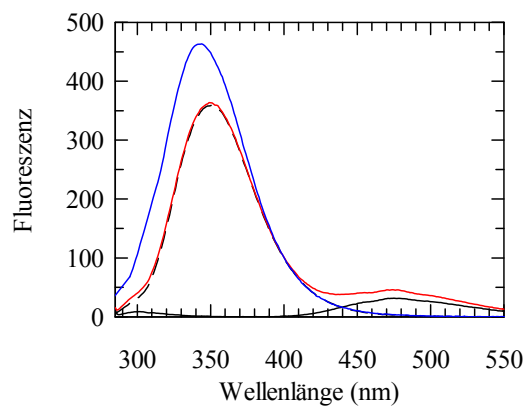


Abbildung S 1: Energietransfer zwischen Mia40-AEDANS und Cox17*. Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren von 0,5 μM Mia40-AEDANS (—), 3 μM Cox17*_{0SS}F50W (---) und einer Mischung beider Proteine (—), sowie einer Mischung aus 0,5 μM Mia40_{C296SC298SW294F} und 3 μM Cox17*_{0SS}F50W (—). Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Alle Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die Spaltbreiten von Anregung und Emission betrugen 3 nm und 5 nm.

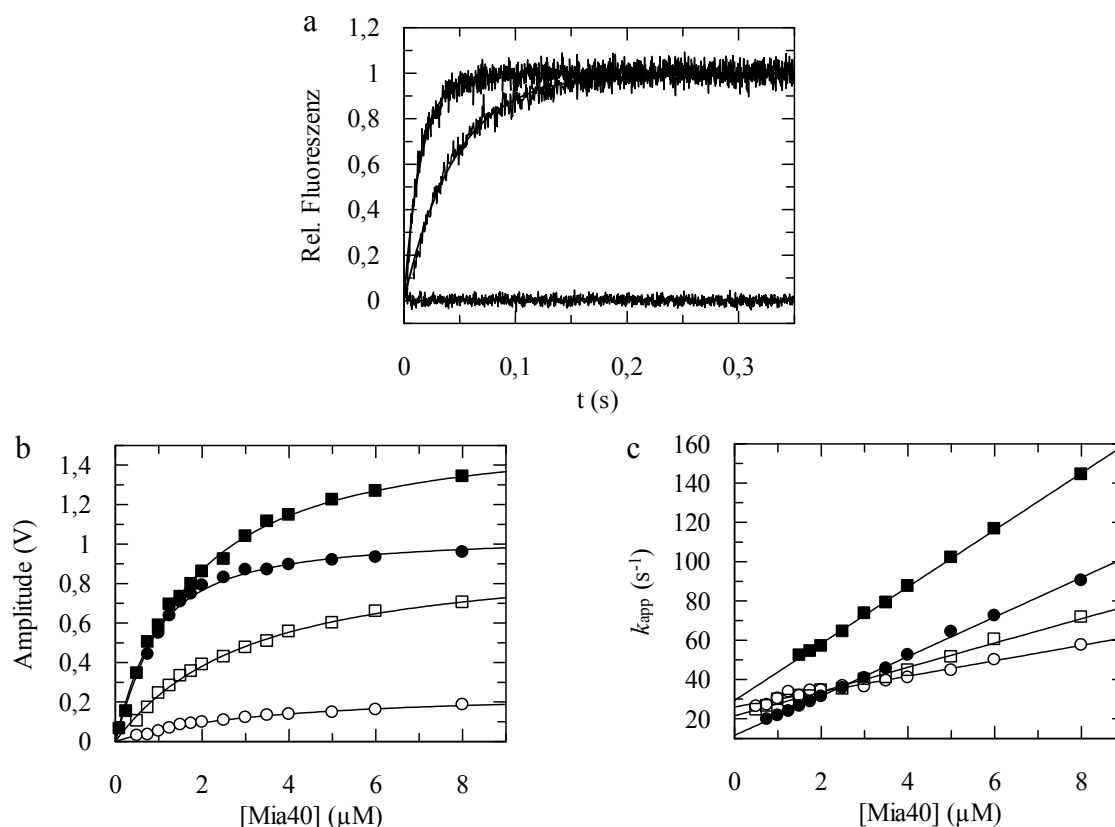


Abbildung S 2: Kinetik der Ausbildung des nicht kovalenten Komplexes zwischen Mia40 und Cox17*. (a) Es wurde die Reaktion von je 0,5 μM Cox17*_{57C}-AEDANS und 0 μM, 1 μM und 5 μM Mia40 (von unten nach oben) anhand der Fluoreszenzänderung über 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Messungen wurden mit Cox17*_{26C}-AEDANS (○), Cox17*_{36C}-AEDANS (□), Cox17*_{47C}-AEDANS (■) und Cox17*_{57C}-AEDANS (●) durchgeführt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Amplituden (b) und Raten (c) gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich an die Amplituden nach Gleichung 6, bzw. einer linearen Regression der Raten. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Alle Messungen wurden bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA durchgeführt.

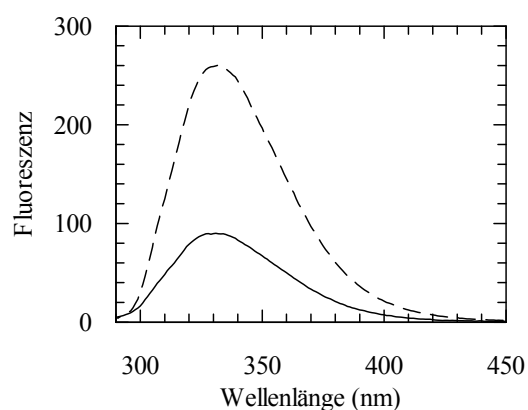


Abbildung S 3: Fluoreszenzspektren von Mia40. Gezeigt sind die Spektren von 1 μM Mia40 (—) in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4, sowie zusätzlich 1 mM TCEP (---) nach Anregung bei 280 nm, gemessen bei 15 °C. Die Spaltbreiten betrugen 3 nm für das Anregungs- und 5 nm für das Emissionslicht.

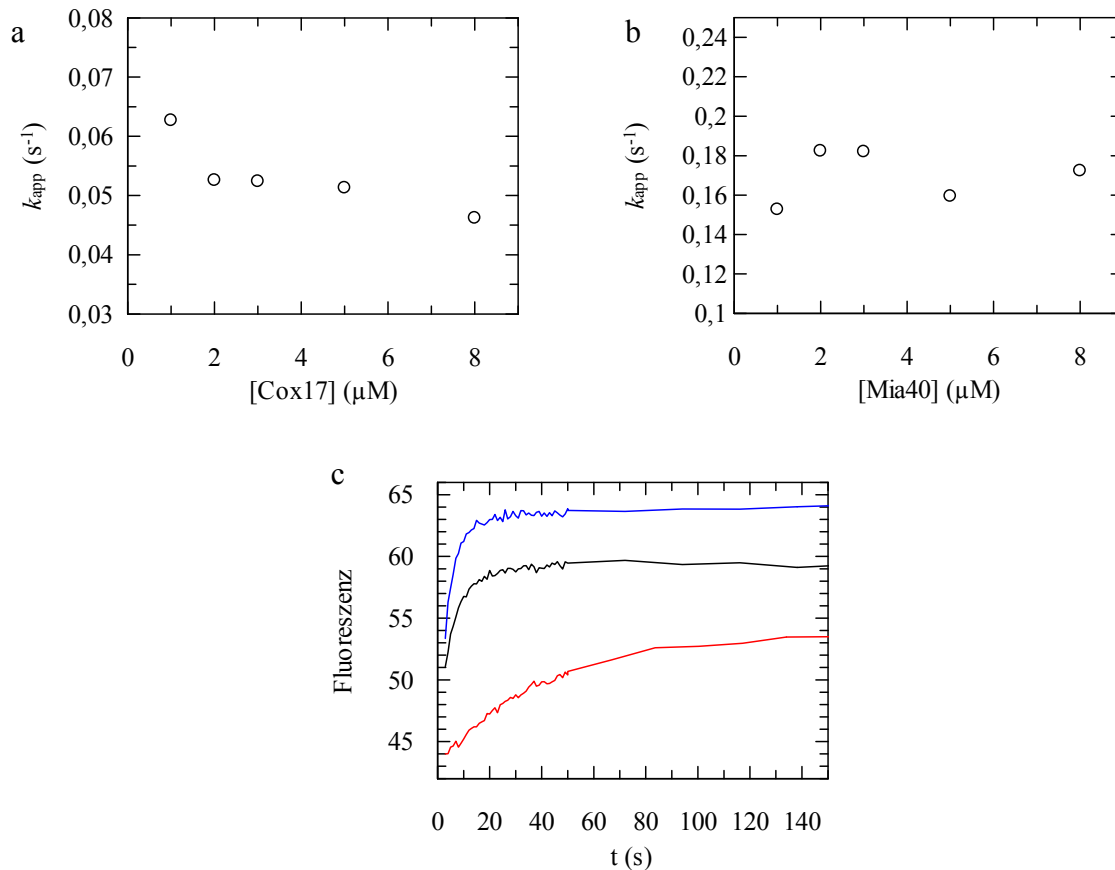


Abbildung S 4: Ausbildung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17*. Gezeigt sind die Raten der Reaktion von (a) 0,25 μM Mia40 und Cox17*_{36C} und (b) 0,25 μM Cox17*_{36C} und Mia40 in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C. (c) Es wurde die Reaktion von 0,25 μM Cox17*_{36C} und je 1 μM Mia40 bei pH 6,2 (—), 7,4 (—) und 8,2 (—) verfolgt. Alle Reaktionen wurden anhand der Fluoreszenzänderung bei 335 nm nach Anregung bei 280 nm detektiert.

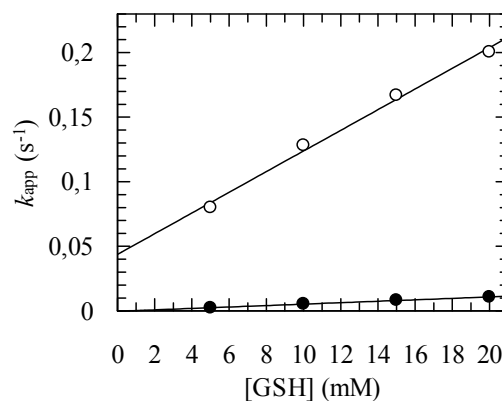


Abbildung S 5: Reduktion des katalytischen Disulfids in Mia40 durch GSH. Es wurde die Reduktion von 0,5 μM Mia40 durch GSH anhand der Fluoreszenzänderung bei 335 nm nach Anregung bei 280 nm in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C verfolgt. Die Fluoreszenzverläufe wurden durch biexponentielle Funktionen angeglichen und die Raten gegen die GSH-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem linearen Angleich an die Datenpunkte, die Ratenkonstanten von $k_1 = 8 s^{-1}M^{-1}$ für die Bildung des gemischten Disulfids mit GSH bzw. $k_2 = 0,6 s^{-1}M^{-1}$ für die Auflösung durch GSH ergeben.

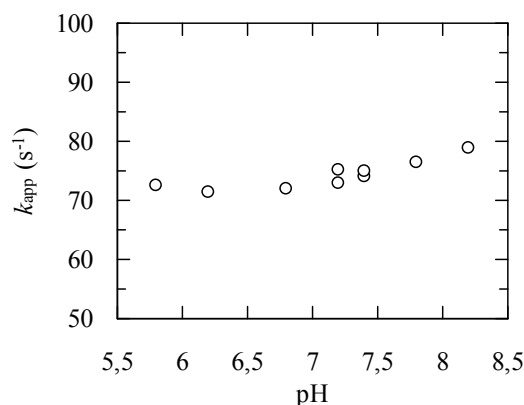


Abbildung S 6: pH-Abhängigkeit der Assoziation von Mia40 und Cox17*. Es wurde die Reaktion von 0,25 μ M Mia40 und 2 μ M Cox17*_{47C}-AEDANS anhand der Fluoreszenzänderung über 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Fluoreszenzverläufe wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Raten gegen den pH-Wert aufgetragen. Die Messungen erfolgten bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 5,8, 6,2, 6,8, 7,2 und 7,4 und 0,1 M Tris/HCl pH^{15 °C} 7,2, 7,4, 8,2 und 9.

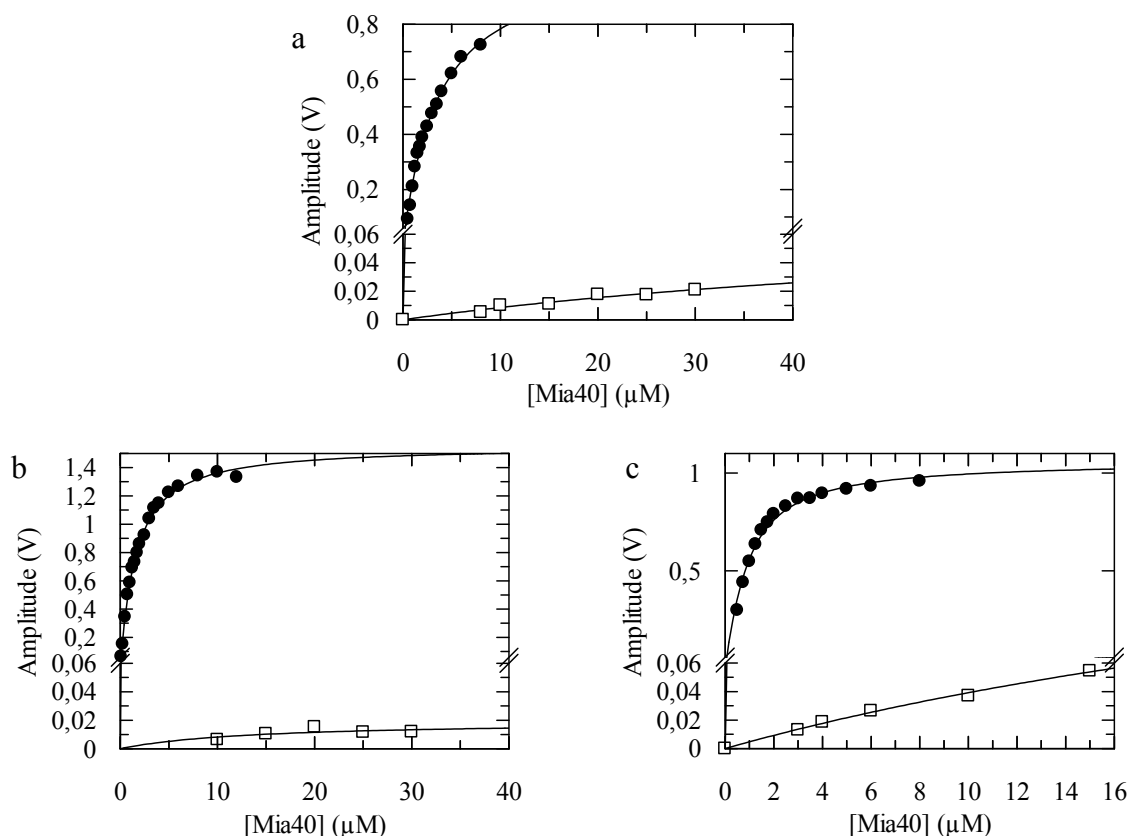


Abbildung S 7: Einfluss der MISS/ITS-Sequenz in Cox17* auf die Komplexbildung mit Mia40. Es wurde die Reaktion von Mia40 und je 0,5 μ M (a) Cox17*_{36C}-AEDANS (●) und Cox17*_{36C}50A51A-AEDANS (□), (b) Cox17*_{47C}-AEDANS (●) und Cox17*_{47C}50A51A-AEDANS (□) und (c) Cox17*_{57C}-AEDANS (●) und Cox17*_{57C}50A51A-AEDANS (□) anhand der Fluoreszenzänderung über 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Amplituden gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich an die Daten gemäß Gleichung 6. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Alle Messungen wurden bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA durchgeführt.

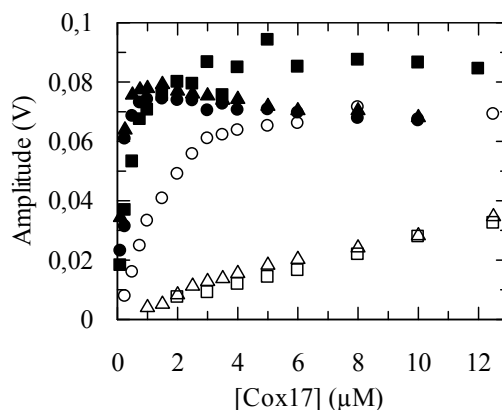


Abbildung S 8: Einfluss der MISS/ITS-Sequenz in Cox17 auf die Ausbildung des gemischten Disulfids mit Mia40. Es wurde die Reaktion von 0,25 µM Mia40 und Cox17*_{36C} (■), Cox17*_{36C}50A51A (□), Cox17*_{47C} (▲), Cox17*_{47C}50A51A (△), Cox17*_{57C} (●) und Cox17*_{57C}50A51A (○) anhand der Fluoreszenzänderung über 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen mit linearem Anteil angeglichen und die Amplituden gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Alle Messungen wurden bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, 1 mM EDTA durchgeführt.

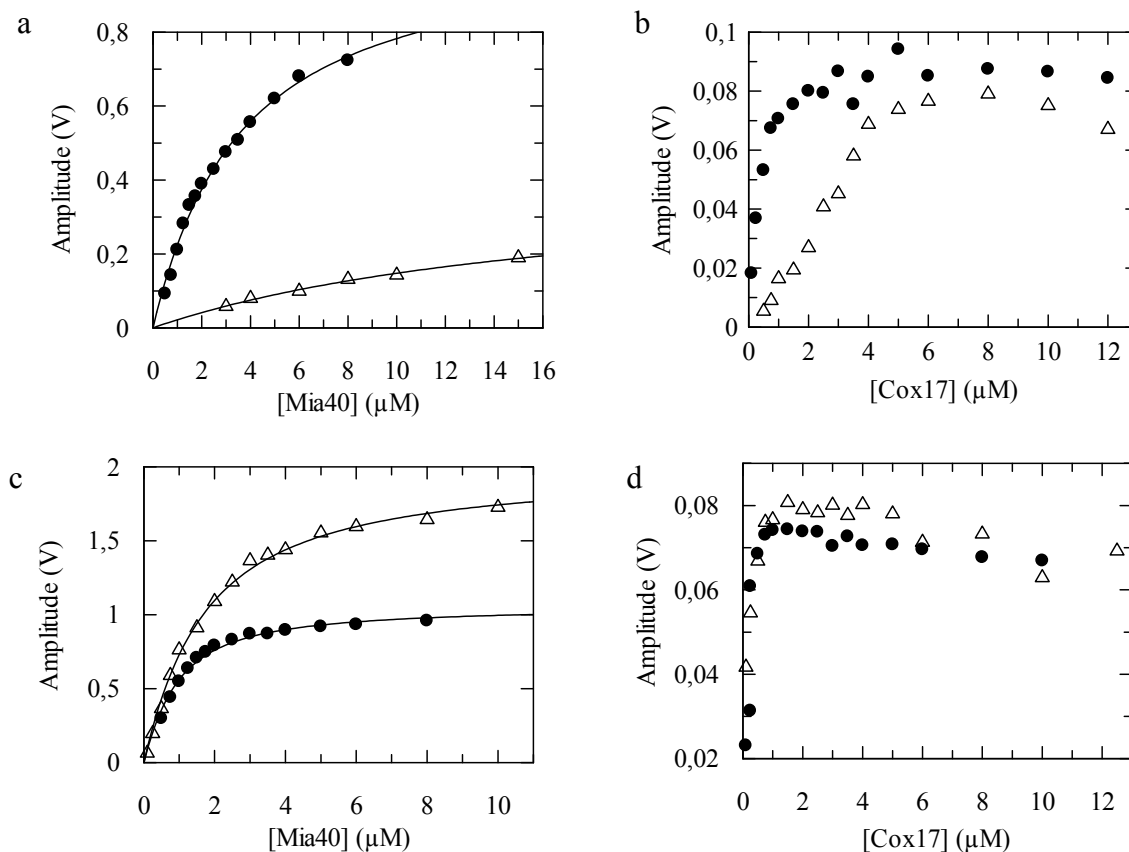


Abbildung S 9: Einfluss der Reste Ile37-Leu38-Phe39 auf die Reaktivität von Cox17*. Es wurde die Reaktion von Mia40 und je 0,5 μM (a) Cox17*_{36C}-AEDANS (●) und Cox17*_{36C}37A38A39A-AEDANS (Δ) bzw. (c) Cox17*_{57C}-AEDANS (●) und Cox17*_{57C}37A38A39A-AEDANS (Δ) anhand der Fluoreszenzänderung über 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Amplituden gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich gemäß Gleichung 6. Weiterhin wurde die Ausbildung des gemischten Disulfids von 0,25 μM Mia40 und (b) Cox17*_{36C} (●) und Cox17*_{36C}37A38A39A (Δ) bzw. (d) Cox17*_{57C} (●) und Cox17*_{57C}37A38A39A (Δ) anhand der integralen Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Alle Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

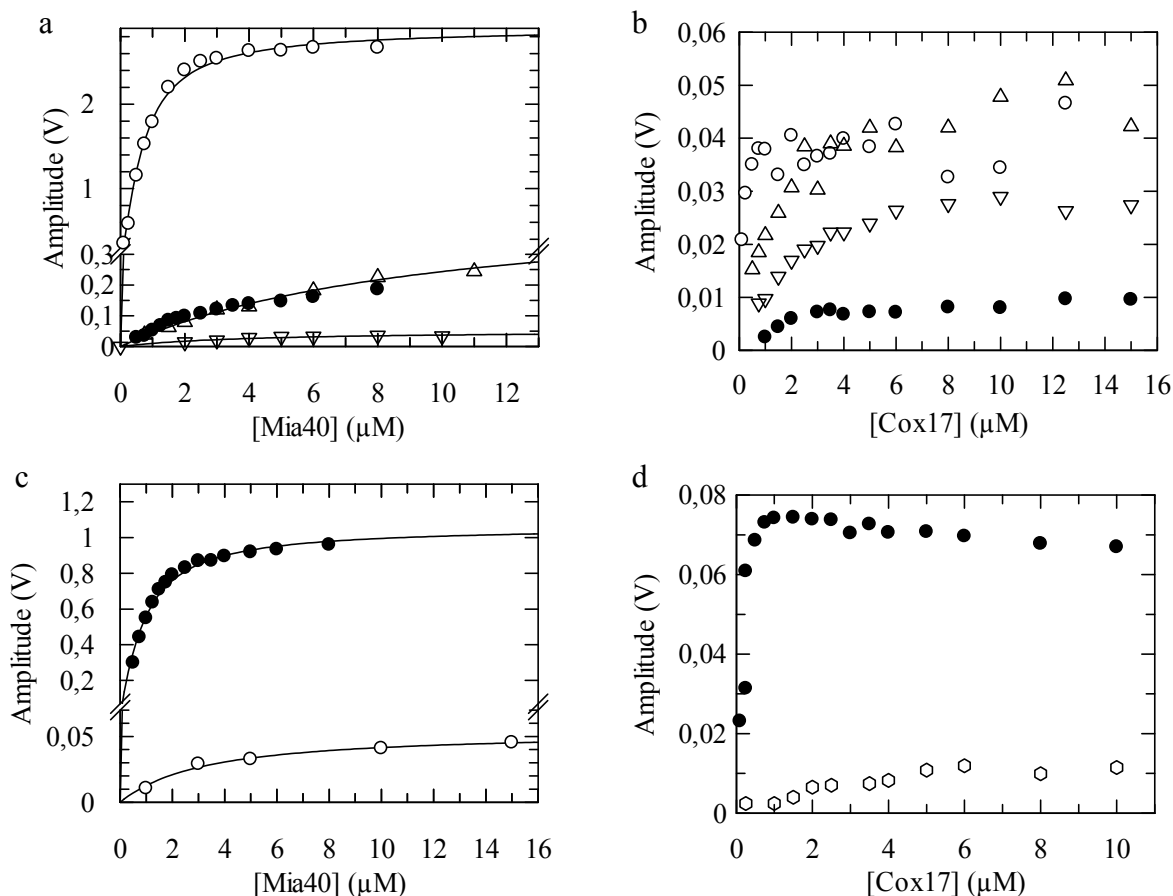
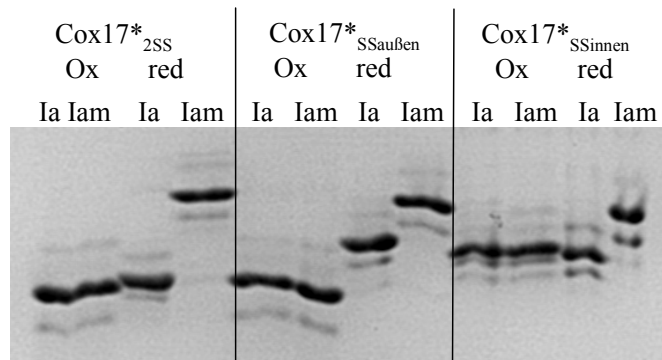


Abbildung S 10: Einfluss der Umgebung von Cys26 auf die Reaktivität. Es wurde die Reaktion von Mia40 und je 0,5 μM (a) Cox17*_{26C}-AEDANS (●), Cox17*_{26C}27I28L29F-AEDANS (Δ), Cox17*_{26C}MISS-swap-AEDANS (○) und Cox17*_{26C}29F30I33Y-AEDANS (▼) bzw. (c) Cox17*_{57C}-AEDANS (●) und Cox17*_{57C}MISS-swap-AEDANS (○) anhand der Fluoreszenzänderung über 460 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Die Kinetiken wurden durch monoexponentielle Funktionen angeglichen und die Amplituden gegen die Mia40-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogenen Linien entsprechen einem Angleich gemäß Gleichung 6. Weiterhin wurde die Ausbildung des gemischten Disulfids von 0,25 μM Mia40 und Cox17*_{26C} (●), Cox17*_{26C}27I28L29F (Δ), Cox17*_{26C}MISS-swap (○) und Cox17*_{26C}29F30I33Y (▼) bzw. (d) Cox17*_{57C} (●) und Cox17*_{57C}MISS-swap (○) über die integrale Fluoreszenz über 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Alle Messungen wurden in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

a



b

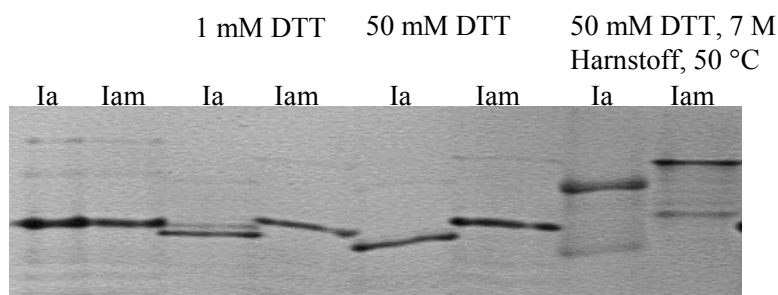


Abbildung S 11: Verschiedene Oxidationszustände von Cox17* und Mia40 können durch nicht denaturierende PAGE getrennt werden. (a) Es wurden jeweils 30 μ M Cox17*, Cox17*_{SSaußen} und Cox17*_{SSinnen} aufgetragen. Die Proteine lagen jeweils in oxidiert oder reduzierter Form vor und wurden sowohl mit Iodacetat (Ia), als auch mit Iodacetamid (Iam) modifiziert. (b) Es wurde jeweils 10 μ M Mia40 aufgetragen. Oxidiertes Mia40 wurde unbehandelt aufgetragen, zusätzlich wurden Proben mit 1 mM und 50 mM DTT versetzt, was zur Reduktion des katalytischen Disulfids führt. 50 mM DTT in 7 M Harnstoff und 50 °C reduzieren auch die strukturellen Disulfide. Alle Proben wurden mit Iodacetat und Iodacetamid modifiziert.

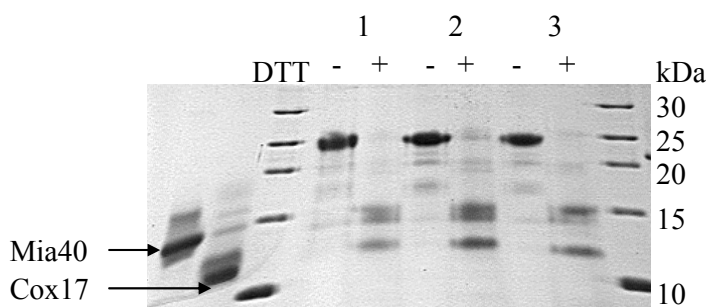


Abbildung S 12: Analyse der Intermediate aus der Oxidation von Cox17* durch Mia40 über 2d Gelelektrophorese. Es wurde reduziertes Cox17* mit Mia40 inkubiert und die Reaktion durch Iodacetamid abgestoppt. Die Proben wurden auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, die gewünschten Banden nach dem Färben ausgeschnitten und auf ein nicht reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Gezeigt sind die gemischten Disulfide der Reaktion von Mia40 mit (1) Cox17*, (2) Cox17*_{SSaußen} und (3) Cox17*_{SSinnen} aus den Gelen in Abbildung 21. + und – gibt an, ob Reduktionsmittel zugegeben wurde. Zusätzlich wurden Mia40 und Cox17* als Vergleich aufgetragen.

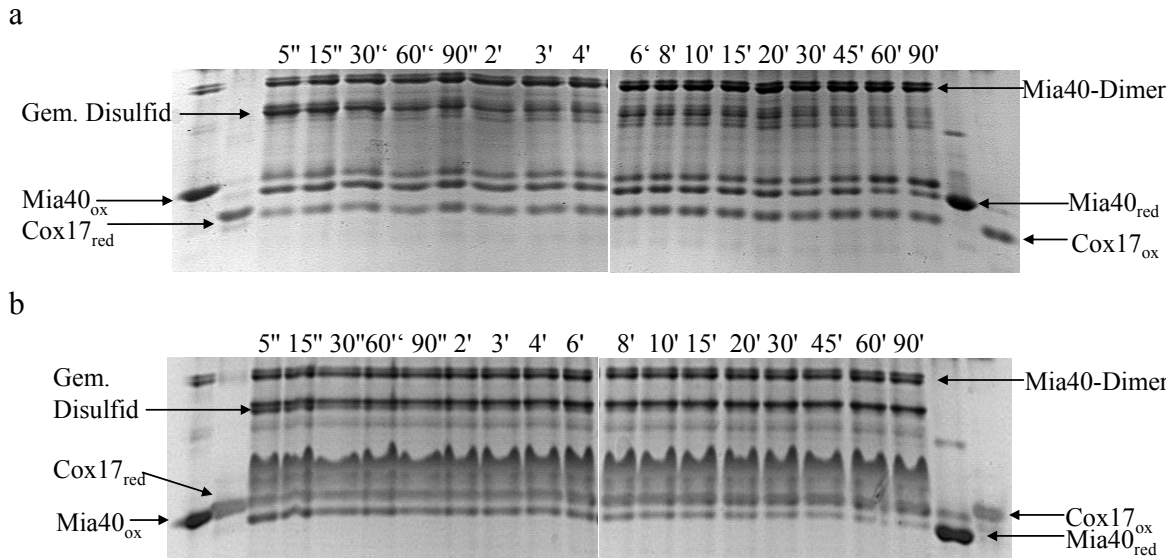


Abbildung S 13: Oxidation von Cox17 durch Mia40. Es wurden je 20 μM (a) reduziertes Cox17* und (b) Cox17*_{SSinnen} mit 50 μM Mia40 bei 15 °C in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat blockiert und die Proben durch native PAGE analysiert.

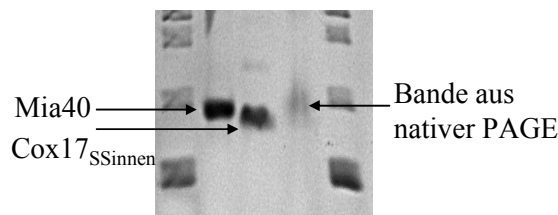


Abbildung S 14: Analyse eines Intermediats aus der Oxidation von Cox17*_{SSinnen} durch Mia40 über 2d Gelelektrophorese. Die diffus laufende Bande aus der Reaktion von reduziertem Cox17*_{SSinnen} mit Mia40, wie in Abbildung 21 c gezeigt, wurde nach dem Färben ausgeschnitten und auf ein nicht reduzierendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

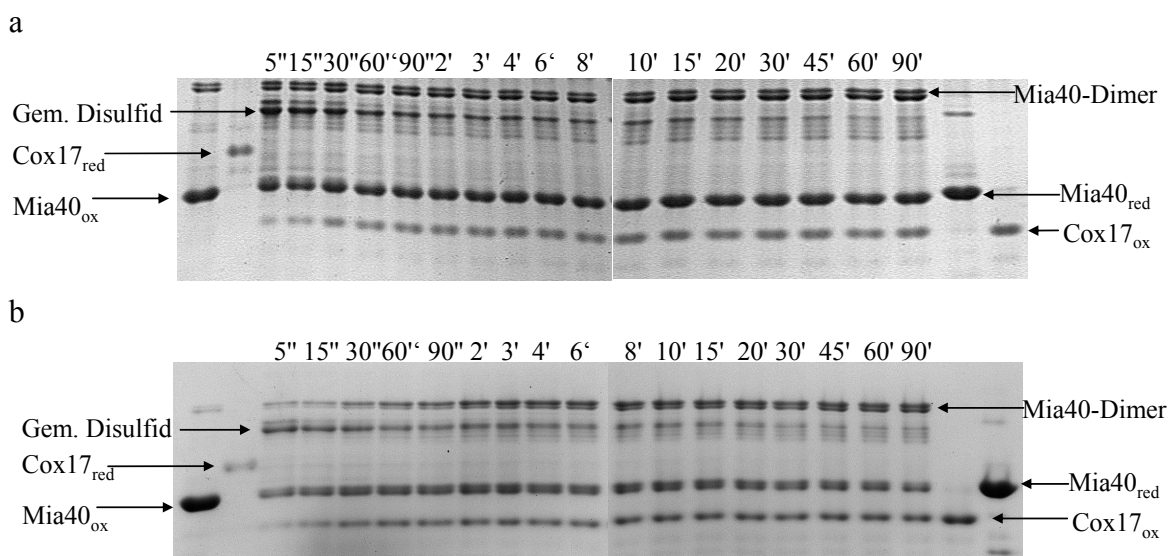


Abbildung S 15: Oxidation von Cox17* durch Mia40. Es wurden je 20 μM reduziertes Cox17* mit (a) 50 μM Mia40 und (b) 50 μM Mia40 und 1 μM Erv1 in 0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetamid blockiert und die Proben durch native PAGE analysiert.

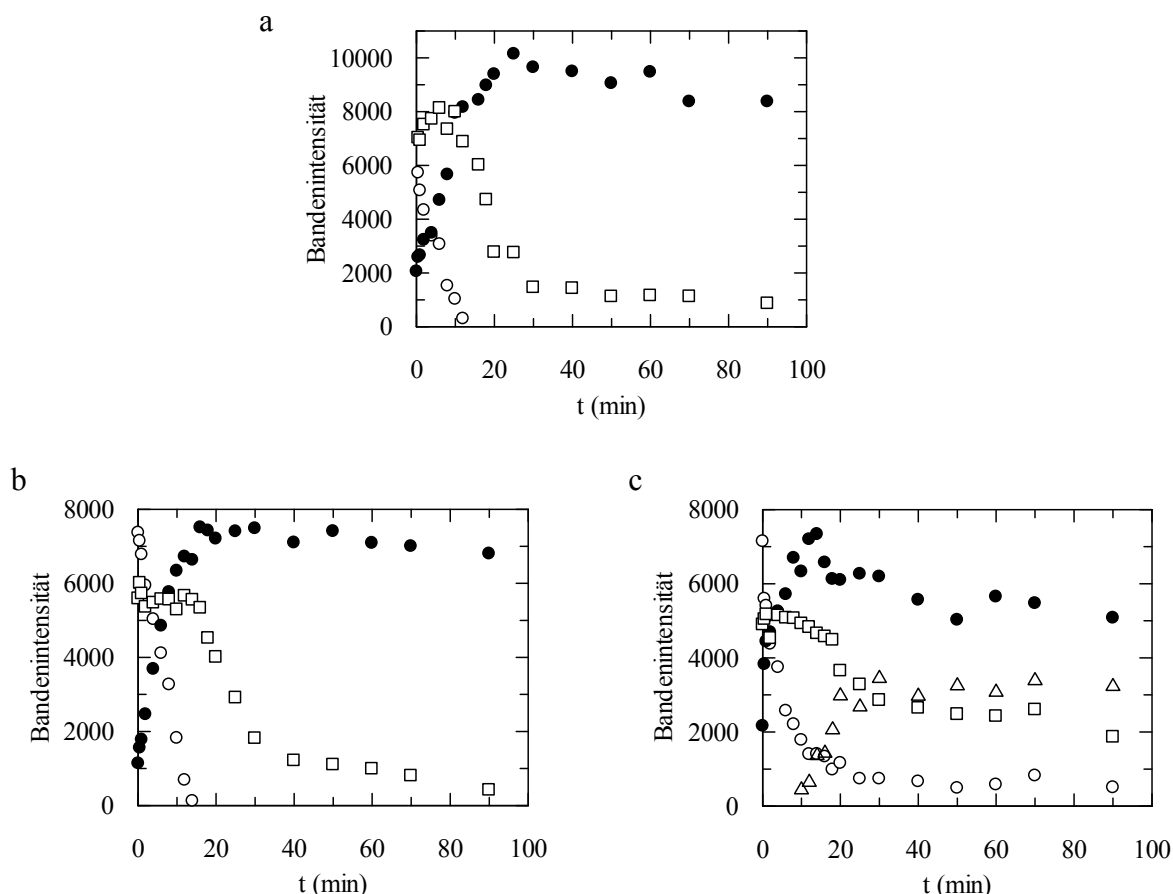


Abbildung S 16: Zeitverlauf der Oxidation von 20 µM der reduzierten Cox17*-Varianten durch 5 µM Mia40 und 1 µM Erv1. Es wurden die Bandenintensitäten der Gele aus Abbildung 24 mit dem Programm ImageJ densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind die erhaltenen Werte für die oxidierten (●) und reduzierten Cox17*-Varianten (○) und das gemischte Disulfid aus Mia40 und den Cox17*-Varianten (□) für (a) Cox17*, (b) Cox17*^{SSaußen} und (c) Cox17*^{SSinnen}. Für Cox17*^{SSinnen} ist zusätzlich der Zeitverlauf der Zunahme der diffus laufenden Bande (Δ) gezeigt, die nicht zugeordnet werden konnte.

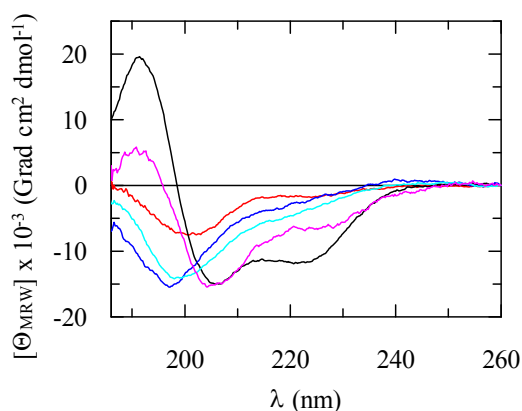


Abbildung S 17: Sekundärstruktur verschiedener Cox17*-Varianten. Gezeigt sind die CD-Spektren von je 4 µM Cox17* (—), Cox17*^{SSinnen} (—), Cox17*^{26C36C} (—), Cox17*^{36C57C} (—) und fehlverbrücktem Cox17* (—). Die Messungen wurden in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt.

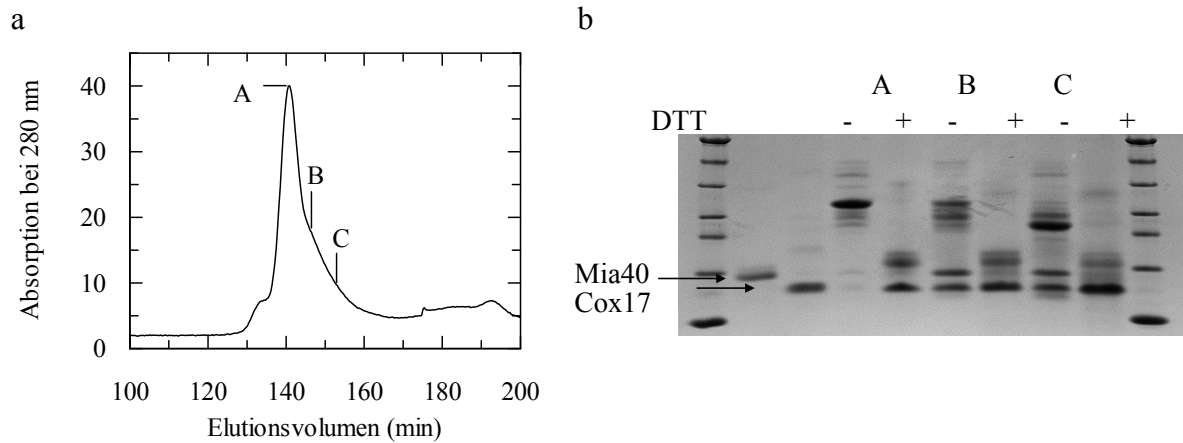


Abbildung S 18: Reinigung des gemischten Disulfids zwischen Mia40 und Cox17*_{36C}. Es wurden äquimolare Konzentrationen Mia40 und Cox17*_{36C} gemischt und die Reaktion sofort durch Zugabe eines 20-fachen Überschusses an Iodacetat gestoppt. (a) Die Probe wurde durch Gelfiltrationschromatographie getrennt und (b) die Peaks durch nicht reduzierende SDS-PAGE analysiert.

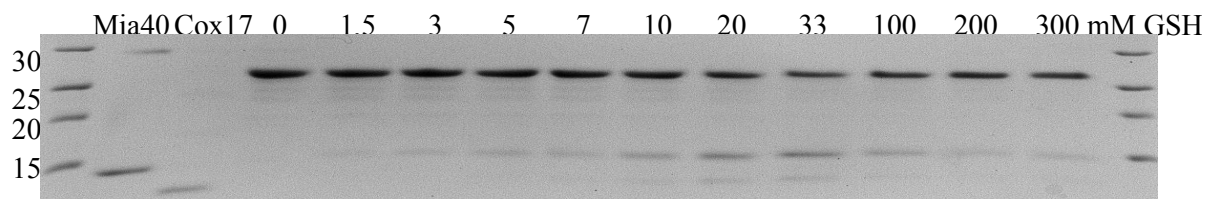


Abbildung S 19: Stabilität der gemischten Disulfide aus Mia40 und Cox17*_{57C} gegenüber Reduktion durch Glutathion. Es wurde 10 μ M des gemischten Disulfids aus Mia40 und Cox17*_{57C} mit 0,1 mM GSSG und den angegebenen GSH-Konzentrationen in 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C für 6 h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Iodacetat abgestoppt und die Proben durch nicht reduzierende SDS PAGE analysiert.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2009 bis März 2014 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt.

Bei ihm möchte ich mich herzlich für die wissenschaftliche Betreuung und die vielen Diskussionen bedanken. Durch den großen Freiraum, den er mir während meiner Arbeit gewährte, konnte ich fachlich und persönlich sehr viel dazu lernen.

Weiterhin danke ich meinen derzeitigen und früheren Laborkolleginnen und –kollegen Anne-Juliane Geitner, Stephanie Hoffmann-Thoms, Philipp Schmidpeter, Stefan Lorenz und Gabriel Zoldák für die schöne Zeit in der B12 und die gute Arbeitsatmosphäre. Christian Wunschel, Felix Fingas, Christian Marx, Christian Lipps, Bianca Nussbaum und Tamara Grund danke ich für ihre Mitarbeit im Rahmen ihrer Bachelor- und Masterarbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Philipp Schmidpeter für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die vielen kurzweiligen Bank- und Kaffeepausen.

Meiner Familie und Philipp danke ich besonders für die Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, 12. März 2014